

Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik



Universität Regensburg

**Herstellung porenüberspannender Lipidmembranen
auf Basis poröser Aluminate und deren
Charakterisierung mittels elektrischer
Impedanzspektroskopie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janine Drexler
aus Lippstadt
2003

Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Steinem
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Kunz
Tag der mündlichen Prüfungen:	20-August-2003
Tag der Promotion:	20-August 2003

*Nichts war,
nichts wird sein-
alles ist,
alles hat Wesen und Gegenwart.
(Hermann Hesse, Siddharta)*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen	3
2.1	Biologische Membranen.....	3
2.2	Phospholipide	4
2.3	Modellmembranen.....	6
2.3.1	Filmwaagetechnik	6
2.3.2	Schwarze Membranen.....	7
2.3.3	Vesikel.....	9
2.3.4	Festkörpergestützte Membranen	9
2.3.5	Porenüberspannende Membranen	11
3	Methoden.....	15
3.1	Elektrische Impedanzspektroskopie	15
3.1.1	Grundlagen.....	15
3.1.2	Messaufbau	17
3.1.3	Auswertung	18
3.2	Interferometrie.....	24
3.3	Rasterkraftmikroskopie	25
3.3.1	Grundlagen.....	25
3.3.2	Messaufbau	27
3.4	Quarzmikrowaage	28
3.4.1	Grundlagen.....	29
3.4.2	Messaufbau	30
4	Präparation	33
4.1	Auswahl des Substrats.....	33
4.2	Herstellung von Aluminatsubstraten.....	34
4.2.1	Grundlagen der Herstellung poröser Aluminate	34
4.2.2	Herstellung poröser Aluminate	38
4.2.3	Grundlagen der Herstellung planarer Aluminate	40
4.2.4	Herstellung planarer Aluminate	41

4.3	Herstellung von Goldelektroden	41
4.4	Präparation von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten.....	42
4.4.1	Präparation von <i>Self-Assembly</i> -Schichten	42
4.4.2	Präparation von Polyelektrolytschichten	43
4.4.3	Präparation von Vesikeln.....	44
4.4.4	Präparation von Lipidmembranen	45

5 Ergebnisse 49

5.1	Charakterisierung der porösen Aluminate	49
5.1.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	49
5.1.2	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen	51
5.1.3	Interferometrische Untersuchungen.....	54
5.1.4	Impedanzspektroskopische Untersuchungen.....	57
5.2	Charakterisierung von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten.....	71
5.2.1	Theoretische Beschreibung festkörpergestützter Lipidmembranen.....	72
5.2.2	Theoretische Beschreibung porenüberspannender Lipidmembranen.....	73
5.2.3	Impedanzspektroskopischer Nachweis idealer Lipidmembranen auf porösen Aluminaten	75
5.2.4	Lipidmembranen auf funktionalisierten Oberflächen.....	77
5.2.5	Fusion von <i>Giant Vesicles</i>	80
5.2.6	Lipidmembranen auf porenüberspannenden Polyelektrolytschichten.....	88
5.2.7	Chemisorbierte Lipidmembranen	99

6 Diskussion 107

6.1	Charakterisierung der porösen Aluminate	107
6.1.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	107
6.1.2	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen	108
6.1.3	Interferometrische Untersuchungen.....	109
6.1.4	Impedanzspektroskopische Untersuchungen.....	111
6.2	Charakterisierung von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten.....	115
6.2.1	Lipidmembranen in der Literatur.....	115
6.2.2	Lipidmembranen auf funktionalisierten Oberflächen.....	116
6.2.3	Fusion von <i>Giant Vesicles</i>	118

6.2.4	Lipidmembranen auf porenüberspannenden Polyelektrolytschichten	120
6.2.5	Chemisorbierte Lipidmembranen	126
6.3	Ausblick.....	128

7 Zusammenfassung..... 131

8 Literaturverzeichnis..... 133

1 Einleitung

Festkörperunterstützte Membranen (*solid supported membranes* -SSMs) sowie schwarze Membranen (*black lipid membranes* -BLMs) sind etablierte Modellsysteme zur Untersuchung grundlegender physikalischer Eigenschaften von Lipiddoppelschichten sowie membran-insertierter Proteine. Besonders die SSMs wurden in den letzten Jahren als vielversprechendes Werkzeug zur Konstruktion von Biosensoren intensiv untersucht. Aufgrund ihrer hohen Langzeitstabilität und durch die Möglichkeit, oberflächenanalytische Untersuchungsverfahren wie Rasterkraftmikroskopie, ATR-Infrarot-, Quarzmikrowaage-Technik und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie zu ihrer Untersuchung einzusetzen, sind sie zur rationalen Entwicklung von Biosensoren geeignet [1-8]. Jedoch ergeben sich durch die Verankerung der Lipidmembranen auf einer Oberfläche gleichzeitig Nachteile, welche ihre Funktionalität zum Teil erheblich einschränkt. Diese Probleme können durch die Verwendung von schwarzen Membranen umgangen werden, die erstmals von Müller und Rudin eingeführt wurden [9]. BLMs erlauben prinzipiell den Einbau von funktionellen Transmembran-Proteinen, ihnen fehlt jedoch eine ausreichende Langzeitstabilität, weshalb sie für Anwendungen in der Biosensorik nicht geeignet sind.

Zur Kombination der Vorteile beider Membransysteme, SSMs und BLMs, wird in der Arbeitsgruppe ein neuer Ansatz verfolgt. Dieser beruht auf Lipidmembranen, die die Poren einer porösen Matrix überspannen. In diesem System können die auf den Porenstegen verankerte Membran als SSM und die porenüberspannenden Regionen als nano-BLMs angesehen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Charakterisierungen und Modifizierungen des porösen Substrats durchgeführt, die ermöglichen, porenüberspannende Lipiddoppelschichten impedanzspektroskopisch nachzuweisen. Darauf aufbauend wurden verschiedene Ansätze zur Präparation porenüberspannender Lipiddoppelschichten beschrieben.

Zur Untersuchung des Ionentransports über die Lipidmembranen müssen diese elektrisch dicht sein. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine elektrisch dichte porenüberspannende Membran impedanzspektroskopisch nachgewiesen werden. Die Ausbildung der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht wurde zudem rasterkraftmikroskopisch bestätigt.

2 Grundlagen

2.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen umgeben lebende Zellen sowie deren Organellen und grenzen sie gegen ihre Umgebung ab. Damit bieten sie mechanischen sowie chemischen Schutz und bilden die Voraussetzung für auftretende Ionengradienten zwischen zwei Kompartimenten, wie z.B. intra- und extrazellulärem Bereich. Neben der Abgrenzung sind sie für einen kontrollierten Stofftransport und für die Aufnahme und Weiterleitung von extrazellulären Signalen verantwortlich. Die Plasmamembran ist mit dem Cytoskelett der Zelle verankert.

Die biologische Membran setzt sich aus Lipiden, Proteinen und Polysacchariden zusammen und bildet damit ein komplexes Vielteilchensystem, das die Untersuchung einzelner Bestandteile und Prozesse erschwert. Nach dem 1972 aufgestellten *fluid mosaic model* von Singer und Nicolson bilden die Lipide dabei eine zweidimensionale Matrix, in der sich die Proteine frei bewegen können [10]. Die Lipide sind aufgrund eines entropisch getriebenen Prozesses und aufgrund ihrer Geometrie in einer Lipiddoppelschicht angeordnet, wobei die hydrophilen Lipidköpfe die Grenzfläche zur wässrigen Umgebung der Zelle bilden und die hydrophoben Fettsäureketten der Lipide in die Membran hineinragen.

Der jeweilige Anteil der einzelnen Bestandteile ist charakteristisch für die einzelnen Membranen und kann je nach Zell- und Membrantyp große Unterschiede aufweisen. So variiert der Gehalt und die Art der Membranproteine, je nachdem, ob es sich z.B. um eine Plasma-, Organellen- oder eine Zellkern-Membran handelt. Die Zusammensetzung dieser Proteine bestimmen dabei größtenteils die biologischen Eigenschaften der Membran, wohingegen die physikalisch-chemischen Eigenschaften vornehmlich durch die Lipide vorgegeben werden. In den meisten biologischen Membranen bilden die Phospholipide die wichtigste Gruppe der Membranlipide. Aus diesem Grund werden sie im folgenden Kapitel eingehender beschrieben.

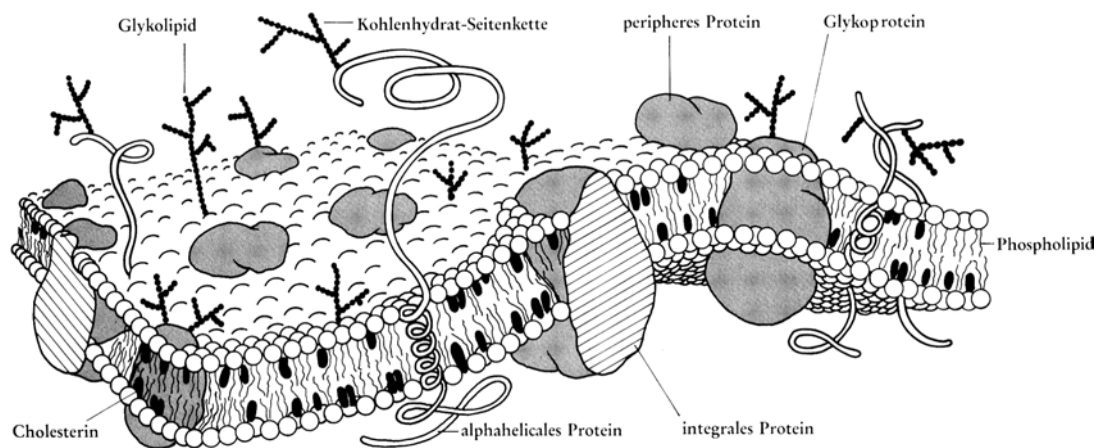


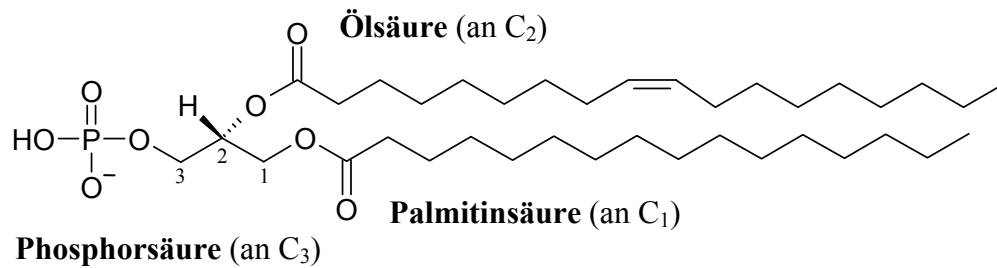
Abb. 2.1. *Fluid mosaic model* der Zellmembran nach Singer und Nicolson [10]. In die zwei-dimensionale Matrix aus Lipiden und Cholesterol sind Proteine eingebettet. Auf der extrazellulären Seite sind einige Proteine und Lipide mit Polysacchariden verknüpft. Quelle: [11]

2.2 Phospholipide

Lipide bilden die zwei-dimensionale Matrix der biologischen Membran, in der sich Proteine und andere Membranbestandteile frei bewegen können. Die wichtigste Gruppe der Membranlipide bilden dabei die Phospholipide, unter ihnen ist das Phosphatidylcholin eines der in der Membran am häufigsten vorkommenden Lipide. Lipide sind amphipatische Moleküle, sie besitzen also sowohl einen hydrophoben als auch einen hydrophilen Bereich. Der hydrophobe Teil besteht aus zwei Fettsäureketten, die mit den Hydroxygruppen am C₁ und C₂ des Glycerins verestert sind. Die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren sind gesättigte oder ungesättigte mit einer Kettenlänge von 14, 16 oder 18 Kohlenstoffatomen. Gemeinsamer charakteristischer Bestandteil der Phospholipide ist ein Phosphorsäure-Rest, der mit der Hydroxygruppe am C₃ des Glycerols verestert ist. Zusammen mit einer sogenannten Kopfgruppe, einem Alkohol, bildet dieser Phosphorsäure-Rest den hydrophilen Teil des Lipids. Mögliche Kopfgruppen bei nativ vorkommenden Phospholipiden sind in Abb. 2.2 B gezeigt. Zusätzlich zu den nativen existieren auch Kopfgruppen, die für spezielle Anwendungen synthetisiert wurden. Zu diesen gehört Thioethanol, welches über die Thiolgruppe eine Chemisorption an Goldoberflächen

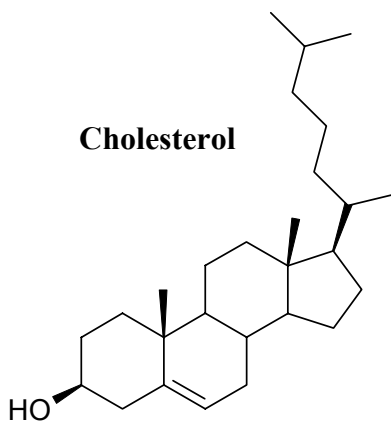
erlaubt. Die Strukturformel eines Lipids ist in Abb. 2.2 A für 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-Phosphatidsäure gezeigt.¹

A

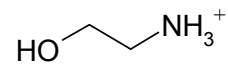


B

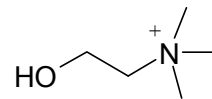
Mögliche Kopfgruppen:



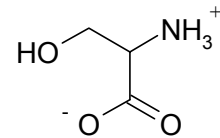
Ethanolamin



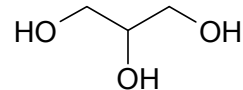
Cholin



Serin



Glycerin



Inositol

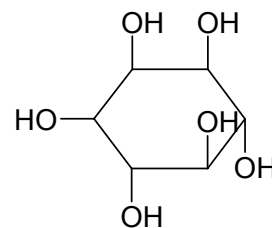


Abb. 2.2. : A) Strukturformel von 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-Phosphatidsäure. Bei nativ vorkommenden Phospholipiden ist die Hydroxygruppe an der Kopfgruppe mit dem Phosphat verestert. B) Cholesterol.

¹ Der Name eines Phospholipids setzt sich aus der Bezeichnung der beiden Fettsäureketten gefolgt vom Namen der Kopfgruppe zusammen.

Neben Phospho- und Glycolipiden enthalten Membranen tierischer Zellen auch Cholesterol. Die Funktion des Cholesterols in der Membran ist noch nicht vollständig geklärt, es hat jedoch einen Einfluss auf die Fluidität [12].

2.3 Modellmembranen

Das Verständnis der Funktionen biologischer Membranen erfordert sowohl die Untersuchung ihrer Struktur als auch des Einflusses der einzelnen Elemente auf ihre Funktion. Aufgrund des außerordentlich komplexen Aufbaus der biologischen Membran ist es sinnvoll, die Untersuchung einzelner Zellmembran-gebundener Prozesse wie zum Beispiel Transportmechanismen anhand von künstlich hergestellten Modellmembranen durchzuführen. Um eine ausreichende Übereinstimmung zwischen Zellmembran und Modellsystem zu gewährleisten, sollten die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Modellsysteme frei einstellbar sein, wie z.B. die laterale Beweglichkeit der Lipide und die chemische Zusammensetzung der Lipidmembran. Für eine Anwendung im Bereich der Biosensorik müssen die Membransysteme zudem eine hohe Langzeitstabilität und gute Reproduzierbarkeit besitzen. Eine spezifische Funktionalität kann durch membrangebundene Proteine erhalten werden. Je nach Anwendung und Nachweismethode haben sich verschiedene Modellsysteme etabliert, die im folgenden kurz vorgestellt werden.

2.3.1 Filmwaagetechnik

Zur Untersuchung amphipatischer Substanzen nutzt man deren Eigenschaft, an einer Luft-Wasser-Grenzfläche eine monomolekulare Schicht auszubilden, die die Oberflächenspannung des Wassers beeinflusst. Grundlage dieses Systems bilden die Untersuchungen von Raleigh und Pockels, die gegen Ende des 19. Jahrhunderts entstanden sind [13]. Für die experimentelle Durchführung wurde eine Filmwaage bestehend aus einem mit Wasser gefüllten Teflontrog und einer beweglichen Barriere, die die Variation der Oberfläche ermöglicht, verwendet. Über ein in die Flüssigkeit eintauchendes Plättchen, das an einer Federwaage befestigt ist, kann der Einfluss der Oberflächenspannung auf die Gewichtskraft des Plättchens gemessen werden (Wilhelmy-System). Der schematische Aufbau einer Filmwaage ist in Abb. 2.3 skizziert.

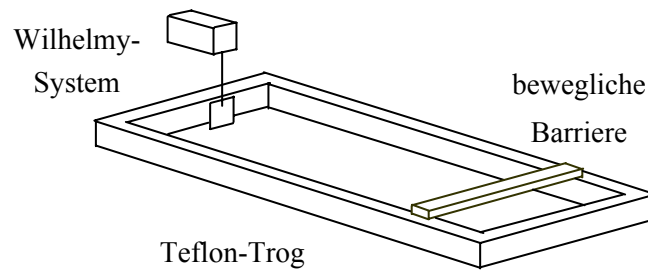


Abb. 2.3. Schematische Darstellung des Aufbaus einer Filmwaage.

Wird eine amphipatische Substanz auf die Luft-Wasser-Grenzfläche aufgegeben und die entstehende monomolekulare Schicht mittels der beweglichen Barriere komprimiert, können, abhängig von der Substanz, bei konstanter Temperatur verschiedene Phasen durchlaufen werden. Im Fall einer DPPC-Isotherme sind diese in einem Druck-Fläche-Diagramm analog einer Isotherme bei der Gaskompression beschreibbar. Bei niedrigem Druck liegt das System in der *liquid-expanded* Phase vor, bei der die Fettsäureketten *gauche-trans-gauche* Kinken ausbilden. Wird der monomolekulare Film komprimiert, findet eine Phasenumwandlung zur *liquid-condensed* und *solid* Phase statt, bei der die Fettsäureketten in der *all-trans* Konformation vorliegen.

Durch Kombination der Filmwaage mit anderen Messtechniken, z.B. der Brewster-Winkel-Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie, können die Bildung und Struktur einzelner Phasengebiete und Domänen untersucht werden [14, 15].

2.3.2 Schwarze Membranen

Schwarze Membranen oder auch *Black Lipid Membranes* (BLM) bildeten das erste Modellsystem, an dem Transportprozesse über die Lipidmembran untersucht werden konnten [16, 17]. Sie sind auch heute noch eine etablierte Methode, um Einzelkanalmessungen an Membranen durchzuführen. So wurde zum Beispiel die antibiotische Wirkung von Gramicidin A über Leitfähigkeitsmessungen an BLMs nachgewiesen [18]. Die Herstellung schwarzer Membranen erfolgt, indem eine geringe Menge eines Lipid-Lösungsmittel-Gemisches mit einem feinen Haarpinsel über ein kleines Loch in einer Teflonwand gestrichen wird. Die Teflonwand trennt zwei Kompartimente, die mit Pufferlösung gefüllt sind (Abb. 2.4).

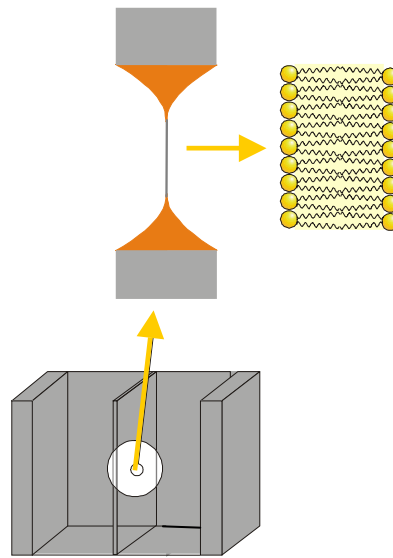


Abb. 2.4. Schematische Darstellung einer schwarzen Membran (*black lipid membrane*, BLM). Die Vergrößerung zeigt das mit einer Lipidmembran überspannte Loch in einer Teflonwand.

Das Lösungsmittel zieht sich an den Rand der Membran zurück, so dass sich die Lipidschicht in kürzester Zeit bis auf eine Doppelschicht ausdünn. Während das aufgegebene Lipid-Lösungsmittelgemisch bei Beleuchtung mit weißem Licht anfangs durch Reflexion und Interferenzeffekte an der Lösungsmittel-Lipidmultischicht in allen Spektralfarben schillert, so erscheint die anschließend entstehende Lipiddoppelschicht schwarz, da aufgrund ihrer Dicke von nur 4 – 6 nm eine destruktive Interferenz auftritt.

Einer der großen Vorteile der schwarzen Membranen liegt in der Zugänglichkeit der beiden Kompartimente, die eine Untersuchung von Transportmechanismen über die Membran erlaubt. Zudem wird der Einbau von membrandurchspannenden Proteinen und Peptiden nicht sterisch behindert. Nachteilig wirken sich die verwendeten organischen Lösungsmitteln aus: Zwar zieht sich das Lösungsmittel größtenteils an den Rand des überspannten Lochs zurück, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich noch Reste des Lösungsmittels in der Membran befinden und die Messungen beeinflussen. Ein weiterer Nachteil der schwarzen Membranen besteht in der geringen Langzeitstabilität, die typischerweise im Bereich einiger Stunden liegt.

2.3.3 Vesikel

Um den Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, dienen Vesikel als weiteres Modellsystem. Bangham et al. fanden, dass die Aggregate, in denen Lipide in wässrigen Lösungen vorliegen, abgeschlossene Kompartimente bilden [19], die als Modellsysteme herangezogen werden können. Zwar führte Bangham die Experimente an multilamellaren Vesikeln durch, sie ließen sich aber mit den Beobachtungen an biologischen Membranen vergleichen. Durch Röntgenbeugungs- und NMR-Experimente² an multilamellaren Vesikeln trug dieses Modellsystem wesentlich zum Verständnis der Struktur von Lipidmembranen bei [20].

Die Herstellung von unilamellaren Vesikeln erfolgt heutzutage üblicherweise über die im Jahre 1985 von Hope eingeführte Extrusionsmethode [21]. Dabei wird eine Suspension multilamellarer Vesikel oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des jeweiligen Lipids oder der Lipidmischung mehrmals durch eine Polycarbonatmembran definierter Porengröße gedrückt. Die entstehenden Vesikel sind unilamellar und besitzen in etwa die Größe der Poren im Polycarbonatfilter. Im Fall von Polycarbonatfiltern mit einer nominellen Größe von 100 nm ergibt sich für die Vesikel eine Größenverteilung (80 ± 25) nm [22, 23].

Vesikel eignen sich als Modellmembranen vor allem zur Untersuchung aktiver Membranproteine. Jedoch gilt zu beachten, dass nach der Präparation kein Zugang mehr zum Innern des Vesikels besteht.

2.3.4 Festkörpergestützte Membranen

Festkörpergestützte Membranen sind aufgrund ihrer hohen Stabilität ein etabliertes und viel genutztes System zur Untersuchung von membrangekoppelten Prozessen. Die hohe Stabilität und die Möglichkeit, verschiedene oberflächensensitive Methoden einzusetzen, erlauben unterschiedlichste Anwendungen in der Sensorik. Die Verfahren zur Charakterisierung festkörpergestützter Membranen reichen von Massenspektroskopie [24, 25] und der Quarzmikrowaagetechnik [26] über Ellipsometrie [27], ATR-Infrarotspektroskopie [28], Rasterkraftmikroskopie [29, 30] bis hin zur Impedanzspektroskopie [2, 7, 31, 32].

Die Präparation festkörpergestützter Membranen kann sowohl über Vesikelfusion [2, 7] als auch über einen Langmuir-Blodgett- [29, 33] bzw. Langmuir-Schäfer-Übertrag erfolgen. Bei der Vesikelfusion wird das Substrat für einige Zeit in einer Vesikelsuspension von unilamellaren Vesikeln definierter Größe inkubiert. Das

² NMR: Nuclear Magnetic Resonance (Nukleare Magnetresonanz)

Spalten der an der Oberfläche adhierten Vesikel führt zu einer festkörpergestützten Lipiddoppelschicht. Die Wechselwirkung zwischen Vesikeln und der Festkörperoberfläche kann dabei entweder auf einer elektrostatischen bzw. entropischen Wechselwirkung beruhen, die durch eine Funktionalisierung der Oberfläche mit geladenen bzw. amphipatischen Molekülen erzielt wird oder die Lipide können über funktionelle Gruppen an der Kopfgruppe eine quasi-kovalente Bindung mit dem Substrat eingehen. Dies kann zum Beispiel über eine Thiolgruppe geschehen, die an Goldoberflächen chemisorbiert (s. Abb. 4.7).

Erfolgt die Präparation über einen Langmuir-Blodgett-Übertrag (LB-Übertrag), so wird ein hydrophiles Substrat in die Subphase des wassergefüllten Teflontrogs der Filmwaage gehängt, das Lipid an der Wasser-Luft-Grenzfläche gespreitet und das Substrat unter konstantem Druck der Lipide langsam aus dem Wasser gezogen. Das Erfolgen des Übertrags lässt sich über die Abnahme der Fläche und das sich daraus ergebende Übertragsverhältnis kontrollieren. Das Übertragsverhältnis R ergibt sich aus

$$R = \frac{A_F}{A_S} \quad (1.1)$$

wobei A_F die Flächenänderung der Oberfläche auf der Filmwaage während des Übertrags bezeichnet und A_S die Änderung der Substratoberfläche, die während des Übertrags durch den Lipidfilm bewegt wurde. Die Lipide bilden auf der Oberfläche des Substrats eine Monoschicht aus [29]. In einem weiteren Übertrag kann durch Eintauchen des Substrats in die wässrige Phase eine zweite Monoschicht präpariert werden. Dabei kann das Substrat sowohl senkrecht (Langmuir-Blodgett) als auch horizontal zur Wasseroberfläche (Langmuir-Schäfer) eingetaucht werden.

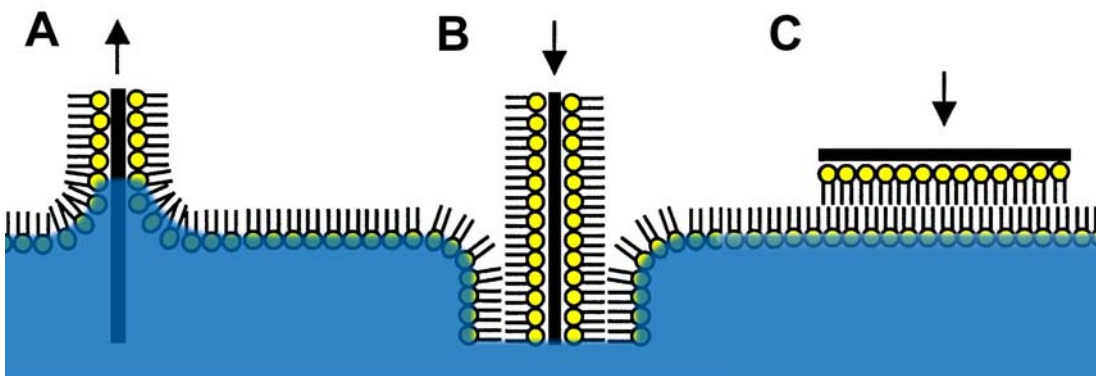


Abb. 2.5. Schematische Darstellung von Filmüberträgen: Die erste Monoschicht wird durch Herausziehen des Substrats aus der wässrigen Phase aufgezogen. Die Darstellung gilt für ein hydrophiles Substrat (A). Durch erneutes Eintauchen des Substrats senkrecht (B) oder parallel (C) zur Wasseroberfläche entsteht im Fall von bestimmten Lipiden eine zweite Monoschicht.

Eine schematische Darstellung der Präparation ist in Abb. 2.5 gezeigt. Allerdings sind nicht alle Lipide und Substrate für den Langmuir-Übertrag geeignet. Gesättigte Phosphoethanolamine z.B. lassen sich mittels der LB-Technik übertragen, im Fall von Phosphatidsäure ist der Übertrag abhängig vom Calciumgehalt der Subphase [13]. Als Substrate dienen hauptsächlich glatte, hydrophile Oberflächen, wie zum Beispiel Glas, Glimmer, monokristallines Silizium oder auch epitaktisch hergestellte Goldoberflächen. Die Wechselwirkung der unteren Monoschicht mit der Substratoberfläche liefert nicht nur das Potenzial dieses Modellsystems, sondern birgt auch Probleme. Zum einen ist der Einbau integraler Proteine und Peptide durch den Festkörper sterisch behindert. Gelingt der Einbau, ist oft die Funktion beeinträchtigt. Dieses Problem kann durch eine dünne Polyelektrolytschicht zwischen Substrat und Lipidschicht behoben werden [1, 3, 6, 34-36]. Cheng et al. lösten das Problem durch Verwendung von *packing* und *Anchor*-Molekülen [37]. Ein weiterer Ansatz zur Vergrößerung des Abstandes zwischen Lipidschicht und Substrat besteht in der Verwendung von Spacerlipiden. Steinem et al. verwendeten Spacerlipide, die über ein Thiol an das Goldsubstrat anbinden [38, 39].

Ein weiteres Problem der festkörpergestützten Lipidschichten besteht darin, dass eine Bindung der Lipide an das Substrat die laterale Diffusion in der unteren Lipidschicht verhindert und schränkt die Diffusion in der oberen Schicht erheblich ein.

2.3.5 Porenüberspannende Membranen

Sowohl schwarze als auch festkörpergestützte Membranen bieten große Vorteile zur Untersuchung membrangekoppelter Prozesse, sind jedoch durch die Nachteile der unzureichenden Stabilität bzw. des Fehlens eines zweiten wässrigen Kompartiments in ihrer jeweiligen Anwendung begrenzt. Ein möglicher Ansatz zur Kombination beider Modelle besteht in der Entwicklung von porenüberspannenden Membranen (Abb. 2.6). Es ist zu erwarten, dass dieses Modellsystem die Vorteile beider Verfahren vereint, und somit sowohl eine hohe Stabilität als auch zwei wässrige Kompartimente aufweist. Die zusätzlichen Anforderungen, die an eine solche Membran gestellt werden, liegen in der Möglichkeit, integrale Proteine zu inkorporieren, in der Zugänglichkeit der Membran für oberflächensensitive Messverfahren und in einer nicht allzu großen Einschränkung der Mobilität der Lipide.

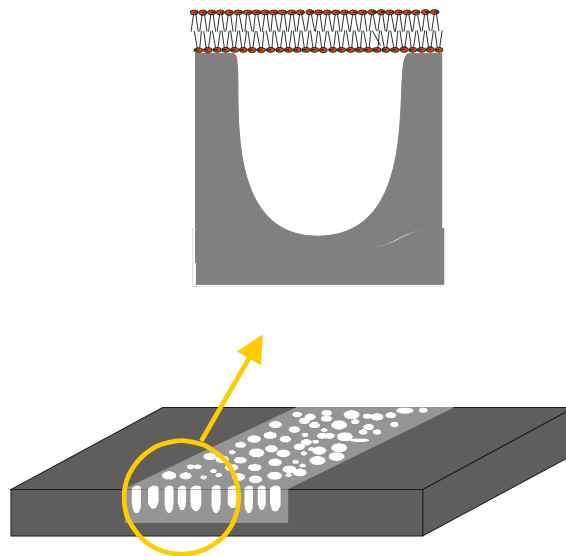


Abb. 2.6. Schematische Darstellung einer porösen Oberfläche mit einer vergrößerten porenüberspannenden Membran.

Mikrofabrizierte Aperturen

In neuester Zeit wurden einzelne Aperturen in Oberflächen hergestellt und diese mit Hilfe verschiedener Techniken mit einer Lipidschicht überspannt. Die zu überspannenden Aperturen weisen üblicherweise eine Größe von mehreren Mikrometern auf, ähnlich der Größe der Poren, die für die Herstellung von BLMs eingesetzt werden. Cheng et al. und Ogier et al. entwickelten eine mikrofabrizierte Apertur aus Photoresist und Gold, die ein Elektrolytreservoir überspannt [40, 41]. Der Durchmesser der Apertur betrug $100\text{ }\mu\text{m}$. Eine Silber-Silberchlorid-Elektrode am Boden des Elektrolytreservoirs ermöglicht die Messung des Stroms über die Lipidmembran. Die Lipide wurden auf die Apertur aufgestrichen, der Nachweis der entstehenden Membran erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie sowie den Einbau von Gramicidin und Alamethicin. Auch mit Silanen oder Poly-L-Lysin funktionalisierte Siliziumoberflächen wurden als Substrat verwendet [42-44].

Osborn und Yager verwendeten Siliziumdioxid mit einer quadratischen Pore von $100\text{ }\mu\text{m}$ Kantenlänge, die Überspannung der Pore mit einer Membran erfolgte über die Langmuir-Blodgett-Technik und wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen [45]. Eine $1\text{ }\mu\text{m}$ große Pore in einer Siliziumnitridschicht wurde von Fertig et al. mit einer Zellmembran überspannt. Der Nachweis erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskopie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie [46]. In einem weiteren Ansatz versahen sie Glas durch gezielten Goldionen-Beschuss mit Poren [47]. Die erhaltenen Poren besaßen einen Durchmesser von etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ und wurden

mittels der BLM-Technik mit einer Membran überspannt. Der Nachweis der Membran erfolgte durch den Einbau von Gramicidin A und die anschließende Messung von Ionenströmen.

Poröse Substrate

Der oft recht schwierige Herstellungsprozess der oben erwähnten Substrate wurde von Favero et al. umgangen, indem kommerzielle Filtermembranen aus Polycarbonat als poröse Oberfläche dienten [48]. Diese Filtermembranen sind in unterschiedlichen Porengrößen erhältlich, die Poren sind gleichmäßig, jedoch nicht geordnet über das Substrat verteilt. Um eine Funktionalisierung der Oberfläche mit 1-Octanthiol zu ermöglichen, wurde das Substrat mit Gold bedampft. Die Lipidmembranen wurden auf die Substrate mit 1 µm großen Poren mittels einer abgewandelten BLM-Technik aufgebracht. Nachgewiesen wurden die porenüberspannenden Lipidmembranen durch die Messung der Ionenleitfähigkeit nach erfolgtem Einbau von Gramicidin D und Valinomycin.

Lieser et al. verwendeten feine Netze aus Kohlenstoff, auf die mit der LB-Technik Monofilme aufgezogen wurden. Die Filme wurden mittels *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS) untersucht und zeichneten sich durch eine große Langzeitstabilität aus [49].

Sowohl Favero et al. als auch Lieser et al. verwendeten geöffnete Poren. Diese erlauben prinzipiell die Herstellung porenüberspannender Membranen, ermöglichen jedoch nicht den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die Membran.

Poröse Aluminate mit geschlossenen Porenböden wurden von Hennesthal und Steinem als Substrat verwendet [50]. Die Membranen wurden mittels Vesikelfusion präpariert und rasterkraftmikroskopisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu den geöffneten Poren erlauben diese lipidüberspannten Substrate prinzipiell den Aufbau von elektrochemischen Gradienten.

3 Methoden

3.1 Elektrische Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie hat sich in den letzten Jahren als wertvolle Methode sowohl zur Charakterisierung von Lipidmembranen als auch zur Untersuchung der Aktivität und Funktionalität von integralen Proteinen und Peptiden bewährt [38, 51, 52]. Der Vorteil der Impedanzspektroskopie gegenüber anderen elektrochemischen Methoden besteht in der kleinen Amplitude des Erregersignals, die eine Messung im Gleichgewichtszustand sowie eine zerstörungsfreie Untersuchung der Probe erlaubt. Die mittels elektrischer Impedanzspektroskopie erhaltenen Parameter ermöglichen die Bestimmung von Leitfähigkeiten und Dielektrizitätskonstanten und erlauben eine Aussage über die Grenzschicht zur Elektrode. Im Falle von Oberflächenfunktionalisierungen oder Lipidmembranen kann die Qualität der auf Festkörperoberflächen immobilisierten Schichten überprüft werden, beispielsweise die Belegung einer Oberfläche. Diese Untersuchungen von Lipidmembranen sind Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.1.1 Grundlagen

Die komplexe elektrische Impedanz, $Z(\omega)$, ist gegeben durch das Verhältnis von angelegtem Spannungssignal $U(\omega)$ und der gemessenen Stromantwort $I(\omega)$ der Probe als Funktion der Frequenz und lässt sich in Polarkoordinaten wie folgt schreiben:

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = \frac{U_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i(\omega t - \varphi(\omega))}} = \frac{U_0}{I_0} e^{i\varphi(\omega)} = |Z(\omega)| e^{i\varphi(\omega)} \quad (3.1)$$

$|Z(\omega)|$ ist der Betrag der Impedanz, $\varphi(\omega)$ die auftretende Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung, ω ist die Kreisfrequenz der Sinusschwingung und ergibt sich als $2\pi f$, i bezeichnet die komplexe Einheit $(-1)^{1/2}$. In kartesischen Koordinaten lässt sich die Impedanz $Z(\omega)$ ausdrücken durch:

$$Z(\omega) = Z' + iZ'' \quad (3.2)$$

Z' bezeichnet den Realteil der Impedanz (Wirkwiderstand), Z'' den Imaginärteil (Blindwiderstand). $\varphi(\omega)$ gibt den Winkel zwischen der Z -Achse und dem Vektor \overrightarrow{OZ} an.

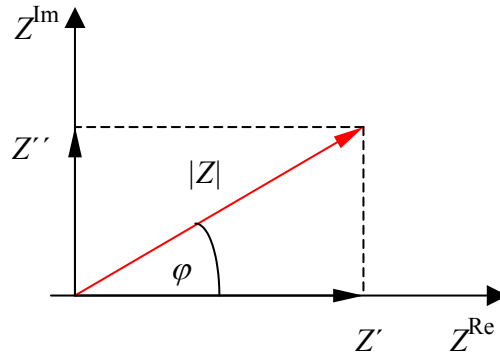


Abb. 3.1. Zeigerdiagramm zur Darstellung der Impedanz in der Gaußschen Zahlenebene.

Polarkoordinaten und kartesische Koordinaten hängen nach Pythagoras über folgende Transformationsgleichungen zusammen:

$$Z' = |Z(\omega)| \cos \varphi(\omega) \quad Z'' = |Z(\omega)| \sin \varphi(\omega) \quad (3.3)$$

$$|Z(\omega)| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad \varphi(\omega) = \arctan(Z''/Z') \quad (3.4)$$

Die in Gleichung (3.4) gegebenen Größen des Betrags der Impedanz $|Z(\omega)|$ und der Phasenverschiebung $\varphi(\omega)$ dienen bei der Impedanzspektroskopie als unabhängige Messgrößen.

Die Darstellung der erhaltenen Spektren kann auf verschiedene Weisen erfolgen, zwei sehr häufig verwendete sind in Abb. 3.2 gezeigt. Die Simulation des Spektrums wurde für einen Ersatzschaltkreis durchgeführt, der sich aus einer Parallelschaltung eines ohmschen Widerstandes R_2 und einer Kapazität C sowie einem seriell dazu geschalteten ohmschen Widerstand R_1 zusammensetzt. Die in Abb. 3.2 A gezeigte Darstellung wird üblicherweise als Bode-Diagramm bezeichnet, aufgetragen werden der Betrag der Impedanz $|Z(\omega)|$ und die Phasenverschiebung $\varphi(\omega)$ gegen die Frequenz f . Bei rein ohmschen Widerständen ist der Betrag der Impedanz frequenzunabhängig, Strom und Spannung sind nicht phasenverschoben. Aus dem frequenzunabhängigen Bereich (3) bei hohen Frequenzen lässt sich der Parameter R_1 ablesen, bei niedrigen Frequenzen $R_1 + R_2$ (Bereich (1)). Bei Kapazitäten zeigt der Betrag der Impedanz eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit von der Frequenz,

die Phasenverschiebung beträgt -90° . Die Kapazität kann im Bereich (2) mittlerer Frequenzen ermittelt werden.

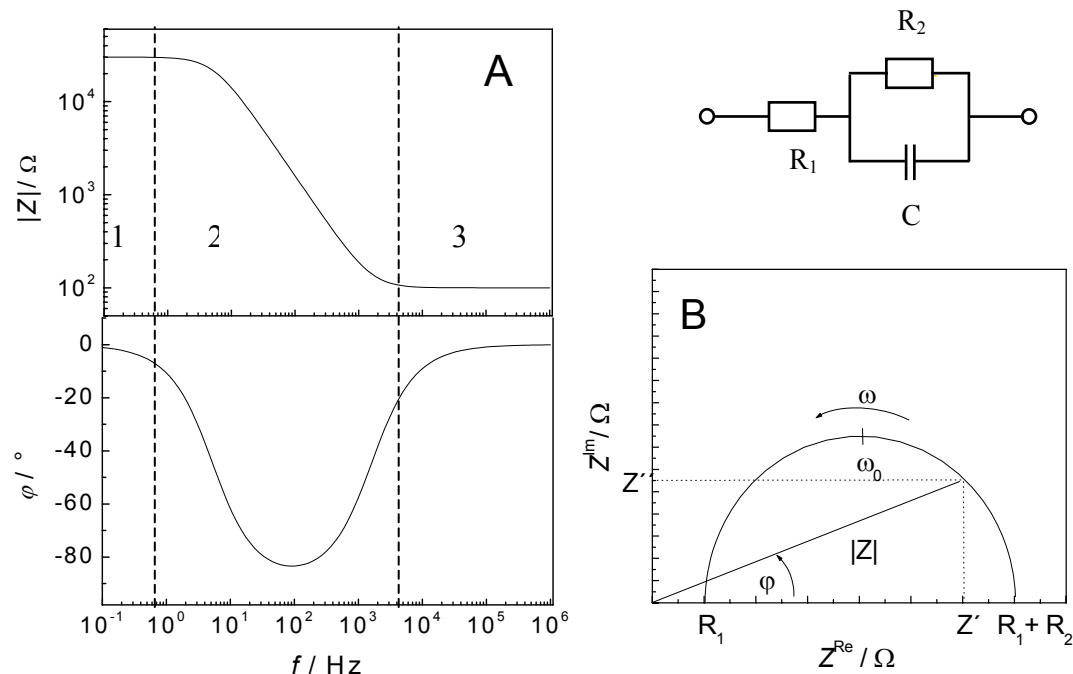


Abb. 3.2. A) Bode-Diagramm des dargestellten Ersatzschaltkreises mit den Parametern $R_1 = 100 \Omega$, $R_2 = 30 \text{ k}\Omega$ und $C = 1 \mu\text{F}$. B) Ortskurve des in A dargestellten Ersatzschaltkreises. Der Pfeil deutet die Richtung wachsender Kreisfrequenz ω an.

Abb. 3.2 B zeigt die Darstellung des Spektrums in der komplexen Zahlenebene, die auch als Nyquist-Plot oder Ortskurve bezeichnet wird. Aufgetragen werden der Imaginärteil der Impedanz gegen den Realteil, der Verlauf der Kreisfrequenz ist durch den Pfeil angedeutet. Der für dieses Schaltbild typische Halbkreis schneidet die reelle Achse für unendlich hohe Frequenzen bei R_1 und für die Grenzfrequenz $\omega \rightarrow 0$ bei $R_1 + R_2$.

3.1.2 Messaufbau

Zur Aufnahme von elektrischen Impedanzspektren werden ein Computer, ein Frequenzganganalysator und eine Messzelle benötigt. Der Frequenzganganalysator besteht aus Generator und Analysator. Im *continuous-wave*-Modus erzeugt der Generator eine sinusförmige Wechselspannung definierter Frequenz und niedriger Amplitude [53], der Frequenzrahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen liegt zwischen 10^{-1} und 10^6 Hz. Durch den Analysator wird aus der resultierenden Stromantwort und der angelegten Wechselspannung die Impedanz des Systems

ermittelt. Ein Computer steuert die Messung und zeichnet die Daten auf. In dieser Arbeit ist der *Impedance Analyser* der Firma Solartron Instruments (SI 1260 Farnborough, UK) verwendet worden. Die angelegte Spannungsamplitude U_{\max} betrug 30 mV. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit den Programmen *ZPlot* und *ZView 2*.

Der Aufbau der für das poröse Aluminat verwendeten Messanordnung ist in Abb. 3.3 schematisch gezeigt. Es wurde eine Zwei-Elektroden-Anordnung gewählt, in der das poröse Aluminat als Arbeitselektrode dient, während ein platinierter Platindraht in der Elektrolytlösung als Gegenelektrode verwendet wurde. Der elektrische Kontakt des Aluminats wurde über einen Stahlkontakt realisiert, der das Aluminat von unten kontaktiert.

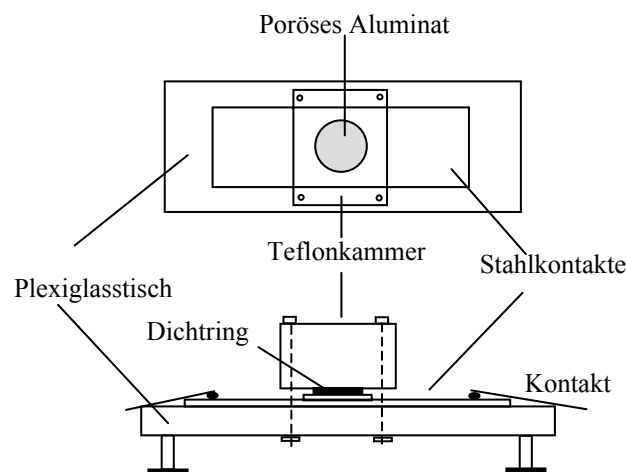


Abb. 3.3. Schematischer Aufbau der verwendeten Messanordnung für das poröse Aluminat. Als Gegenelektrode dient ein platinierter Platindraht.

3.1.3 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgt nach dem in Abb. 3.4 gezeigten Schema: Der erste Schritt besteht in der Aufstellung eines physikalisch sinnvollen Ersatzschaltbildes. Die Impedanz dieses Ersatzschaltbildes muss zum einen die gleiche Frequenzabhängigkeit aufweisen wie die Daten, zum anderen sollte es eine physikalisch sinnvolle Zuordnung der Impedanzelemente zu den einzelnen Systemeigenschaften (wie Doppelschichtkapazität, Durchtrittswiderstand etc.) erlauben. Darüber hinaus ist es wünschenswert, die einzelnen Parameter auf systemspezifische Eigenschaften des Systems wie z.B. Oberflächenrauigkeit beziehen zu können.

Auf Basis von frei wählbaren Startparametern wird im zweiten Schritt der Auswertung das frequenzabhängige Impedanzverhalten des Ersatzschaltkreises über eine nicht-lineare Kurvenanpassung an die Daten angepasst. Diese Anpassung erfolgt über die *Nonlinear least square fit* Methode, z. B. nach Levenberg-Marquardt [53]. Nur bei sehr einfachen Systemen ist eine Auswertung der Daten ohne Anpassung möglich. Im Falle einer nicht zufriedenstellenden Übereinstimmung müssen entweder die Startparameter geändert oder ein neues Ersatzschaltbild aufgestellt werden. Im Anschluss an diese Auswertung folgt die Zuordnung von physikalischen Eigenschaften zu den einzelnen Impedanzelementen sowie der Bezug zu systemspezifischen Parametern.

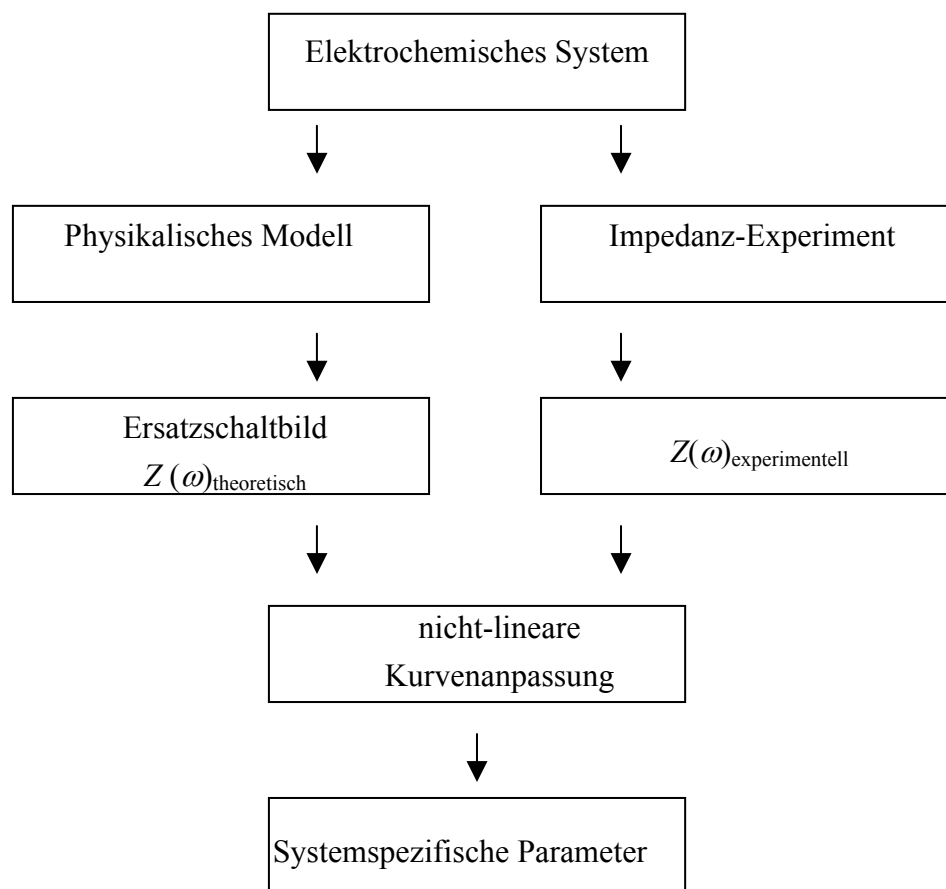


Abb. 3.4. Schematische Darstellung der Auswertung.

Für die Ersatzschaltkreise werden häufig ideale Impedanzelemente (ohmscher Widerstand R , Kapazität C und Induktivität L) verwendet. Eine Zusammenfassung der Impedanzen und Phasenverschiebungen für die einzelnen Bauelemente ist in Tab. 3.1 gegeben.

Tab. 3.1. Impedanzen und Phasenverschiebungen einzelner Bauelemente.

Impedanzelement	Impedanz Z	Phasenverschiebung
Ohmscher Widerstand R	R	0°
Kapazität C	$1/i\omega C$	-90°
Induktivität L	$i\omega L$	$+90^\circ$
<i>Constant Phase Element</i> CPE	$A^{-1}(i\omega)^{-\alpha}$	$-90^\circ < \varphi < 0^\circ$

Diese Bauelemente beschreiben die realen Systeme oftmals jedoch nur unzureichend, da sie den lokalen, strukturellen und energetischen Heterogenitäten nicht gerecht werden. Liegt z.B. eine sehr fraktale Oberfläche vor, kann es sinnvoll sein, die Kapazität durch ein *Constant Phase Element* (CPE) zu ersetzen, das dieser Fraktalität Rechnung trägt [54-57]. Das *Constant Phase Element* wurde 1941 von Cole und Cole eingeführt [58], da viele Flüssigkeiten und Festkörper eine frequenzabhängige Dielektrizitätskonstante ε aufweisen. Eine einheitliche Kapazität C ist in diesem Fall nicht bestimmbar, da diese direkt proportional zur Dielektrizitätskonstante ε ist. Nach der Debye-Theorie für polare Flüssigkeiten lässt sich die Situation über eine komplexe Dielektrizitätskonstante $\varepsilon^* = \varepsilon' - i\varepsilon''$ beschreiben. Eine frequenzabhängige Darstellung in der komplexen Ebene resultiert idealerweise in einem Halbkreis mit dem Mittelpunkt auf der reellen Achse und den Schnittpunkten ε_0 für niedrige Frequenzen und ε_∞ für hohe Frequenzen³ (s. Abb. 3.5 A). Der auftretende Unterschied zwischen ε_0 und ε_∞ wird auf die Dipolpolarisation zurückgeführt. Die theoretische Analyse führt im Fall molekularer Wechselwirkungen nach Debye zu

$$\varepsilon^* - \varepsilon_\infty = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau_0} \quad (3.5)$$

mit ω als Kreisfrequenz und τ_0 als Relaxationszeit, die sich als Produkt aus dem Widerstand R und der Doppelschichtkapazität C_0 ergibt. In vielen experimentellen Fällen liegt der Mittelpunkt des erhaltenen Kreisausschnittes jedoch nicht wie erwartet auf der reellen Achse, sondern unterhalb wie in Abb. 3.5 B gezeigt.

³ ε_∞ entspricht dem Quadrat des optischen Brechungsindex n .

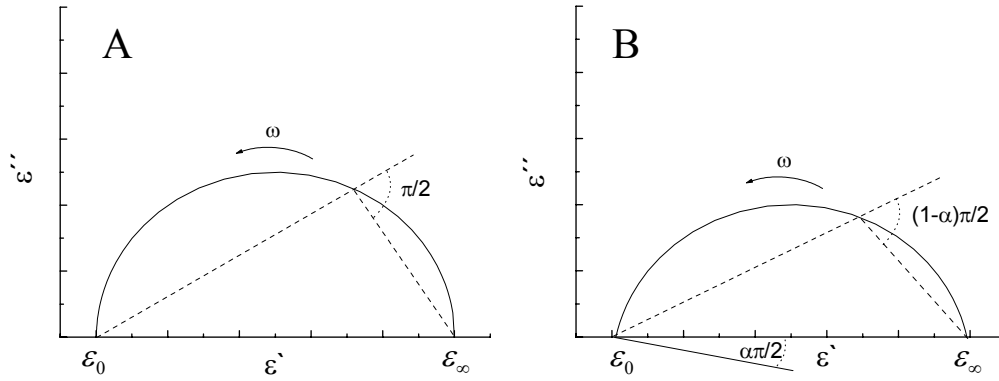


Abb. 3.5. Frequenzabhängige Darstellung der Dielektrizitätskonstanten in der komplexen Ebene. A) Für den idealen Fall nach Debye liegt der Mittelpunkt des erhaltenen Kreisausschnittes auf der reellen Achse. B) In vielen experimentellen Fällen liegt der Mittelpunkt des erhaltenen Kreisausschnittes unterhalb der reellen Achse.

Als Maß für die Abweichung der Daten von der Debye-Theorie führten Cole und Cole den Parameter α mit $0 < \alpha < 1$ ein⁴. Diese Abweichung kann über den Winkel zwischen den beiden Vektoren bestimmt werden, der $(1-\alpha)\pi/2$ entspricht und somit keine Frequenzabhängigkeit aufweist (Abb. 3.5 B). Der Winkel $\alpha\pi/2$ wird vom Radius r am Punkt ε_∞ und der reellen Achse aufgespannt und entspricht der frequenzunabhängigen Phasenverschiebung. α kann somit als Maß für die Abweichung vom idealen Bauelement gesehen werden. Die von Debye beschriebene Gleichung wurde von Cole und Cole wie folgt erweitert:

$$\varepsilon^* - \varepsilon_\infty = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau_0)^{1-\alpha}} \quad (3.6)$$

Die Debye-Theorie ist in dieser Gleichung für den Grenzfall $\alpha = 0$ enthalten. Zur Darstellung dieses Verhaltens in einem elektrischen Ersatzschaltkreis gibt es verschiedene Ansätze: Cole und Cole [58] ersetzen den von Debye gegebenen Widerstand $\tau_0 / (\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty)$ durch eine komplexe Impedanz:

$$Z = \frac{\tau_0 (i\omega\tau_0)}{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty} \quad (3.7)$$

weisen jedoch darauf hin, dass dies lediglich einer der möglichen Wege ist, die experimentellen Fakten auszudrücken. Sowohl Real- als auch Imaginärteil hätten

⁴ In der Literatur wird für die Bezeichnung dieses Parameters neben α oftmals n gewählt.

keine konventionelle Bedeutung. Die am häufigsten gefundene Formulierung der Impedanz des *Constant Phase Elements* ist gegeben durch:

$$Z = A^{-1}(i\omega)^{-\alpha} \quad (3.8)$$

[54, 55, 57, 59-64]. A entspricht für $\alpha = 1$ einer Kapazität C , für $\alpha = 0$ dem reziproken Widerstand R^{-1} (Leitfähigkeit G).

De Levie [65] und Scheider [56] beschreiben dieses Dispersionsphänomen als endlos lange, verzweigte Netzwerke von Kapazitäten und Widerständen. Unterschiedliche Grade der Verzweigung führen zu verschiedenen Werten für den Index α [66]. Die Gründe für das Auftreten der Dispersion konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden und sind Gegenstand vieler Diskussionen in der Literatur. Cole und Cole [58] diskutierten den Effekt der molekularen Form, eine Verteilung der Relaxationszeiten sowie den komplexen Koeffizient der Viskosität als mögliche Ursachen, verwarfen jedoch alle Erklärungsansätze als nicht zufriedenstellend. Brug et al. [67] führen die Abweichung vom idealen Verhalten auf die elektrische Doppelschicht zurück, da sich die Stromdichte als Resultat einer Oberflächeninhomogenität entlang der Elektrodenoberfläche verteile. Kerner und Pajkossy [57] fanden durch Experimente an mechanisch aufgerauhtem Gold sowie aufgerauhten und getemperten Goldproben, dass das CPE auf Oberflächeninhomogenitäten atomarer Skala beruht und nicht wie zuvor angenommen auf einer Rauigkeit größerer Skala. Ein zusätzlicher Faktor sei die spezifische Anionenabsorption. Im Falle einer glatten Oberfläche und fehlender Anionenabsorption verschwinde die Dispersion. Zu einem ähnlichen Schluss kamen Sadkowski et al. [62, 68], die das Auftreten des CPEs neben der Fraktalität der Oberfläche auf Faktoren wie Adsorption von Elektrolytkomponenten, Lösungsmittelleffekte sowie auf das Elektrodenpotential zurückführten. Scheider hingegen fand, dass die Polarisation zwar in der Elektrolytphase lokalisiert, seinen Daten zufolge aber weder Lösungsmittel- noch Ionenspezifisch sei. Die Abhängigkeit der Polarisation von Elektrolyteigenschaften bestehe im Wesentlichen in seiner Leitfähigkeit [56]. Er führt die Dispersion auf ein Fehlen von Glattheit der Oberfläche zurück. Die Ansicht, dass das Auftreten des CPE auf die Oberflächenrauigkeit zurückzuführen ist, wird von Diao et al. geteilt [55]. Sie nutzen den Parameter α , um den Grad der Unordnung von Thiolschichten auf Gold zu bestimmen. Direkt nach Zugabe der Thiollösung verzeichneten sie einen starken Anstieg von α , gefolgt von einer langsamen Annäherung an den Endwert. Sie führten dies auf die schnelle Adsorption und den langsamen Kristallisationsprozess zurück. Ujvari et al. beschichteten Goldelektroden mit Aminen und fanden eine Abhängigkeit der Dispersion von der Inhomogenität des Films. Die

Oberflächenrauigkeit des Substrates spielen, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle.

Eine rege Diskussion um den Zusammenhang zwischen der idealen Polarisierbarkeit einer Elektrode und dem Auftreten des CPE wurde von Zoltowski [64] gestartet. Seiner Meinung nach besteht die Voraussetzung für die ideale Polarisierbarkeit im Fehlen von Energiedissipation, weshalb nur Elektroden mit einer reinen Kapazität ($\alpha = 1$) ideale Polarisierbarkeit aufweisen könnten. Das *Constant Phase Element* erfülle diese Voraussetzungen hingegen nicht, da die Energiedissipation eine intrinsische Eigenschaft des CPEs darstelle. Zudem sei die Kapazität der Doppelschicht nicht genau bestimmbar, da der Faktor A für einen von 1 verschiedenen Wert α nicht mit einer Kapazität gleichgesetzt werden könne. Nach Lang und Heusler [61] ist die ideale Polarisierbarkeit über die Unmöglichkeit eines Ladungstransfers über die Grenzfläche definiert. Die im Fall eines CPE auftretende Energiedissipation kann laut ihnen auf unterschiedlichste Effekte zurückgeführt werden, die nicht mit einem Ladungstransfer gekoppelt sind und eine ideale Polarisierbarkeit der Elektrode nicht ausschließen. Als solche Effekte werden Hitzeentwicklung aufgrund von dielektrischem Heizen, Emission von elektromagnetischen oder akustischen Wellen und Adsorption genannt. Zudem habe die Frage der idealen Polarisierbarkeit im Fall des CPE keine Relevanz, da diese stark an einen Gleichgewichtszustand geknüpft sei, während die Impedanz des CPE der Transferfunktion eines linearen Systems entspricht und die Antwort des Systems auf ein Anregungssignal darstellt. Auch sei in vielen Fällen eine Beschreibung der Doppelschicht über eine Kapazität zulässig. Sadkowski [68] unterstützt in einer nachfolgenden Publikation die Auffassung Zoltowskis der Unvereinbarkeit von CPE-Verhalten und idealer Polarisierbarkeit und belegt dies über eine mathematische Beschreibung des Problems mittels der Lippmann-Gleichung. Das CPE hält er physikalisch für unrealisierbar, da sowohl unendliche Ladung als auch unendliche Energie benötigt würden, um nach erfolgter Potentialstörung einen neuen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Er vermutet, dass die Universalität des CPE als Modell für Festkörperelektroden auf Oberflächenstrukturen unterschiedlicher Ladungsdichte zurückzuführen ist. Diese Strukturierung führe zu einer experimentell nicht unterscheidbaren Kopplung von diversen, lokalen Kapazitäten mit lokalen Elektrolytwiderständen. Als Konsequenz weise die uneinheitliche Elektrode ein nicht-ideales Verhalten auf, selbst wenn sie lokal ideal polarisierbar ist.

3.2 Interferometrie

Die Interferometrie ist eine Methode zur direkten Bestimmung der optischen Dicke $2nd$ einer Schicht, die sich an einer dünnen Schicht auftretenden Interferenzeffekte zunutze macht. Ist der Brechungsindex n bekannt, ermöglicht dies die Bestimmung der Schichtdicke d . Fällt Licht auf die zu untersuchende dünne Schicht, findet sowohl an der Ober- als auch an der Unterseite der dünnen Probenschicht eine Teilung des Strahls in einen reflektierten und einen transmittierten Strahl statt. Zwischen den reflektierten Strahlen treten Interferenzeffekte auf (Abb. 3.6 A), die bei der Verwendung von monochromatischem Licht je nach Schichtdicke konstruktiv oder destruktiv sind.

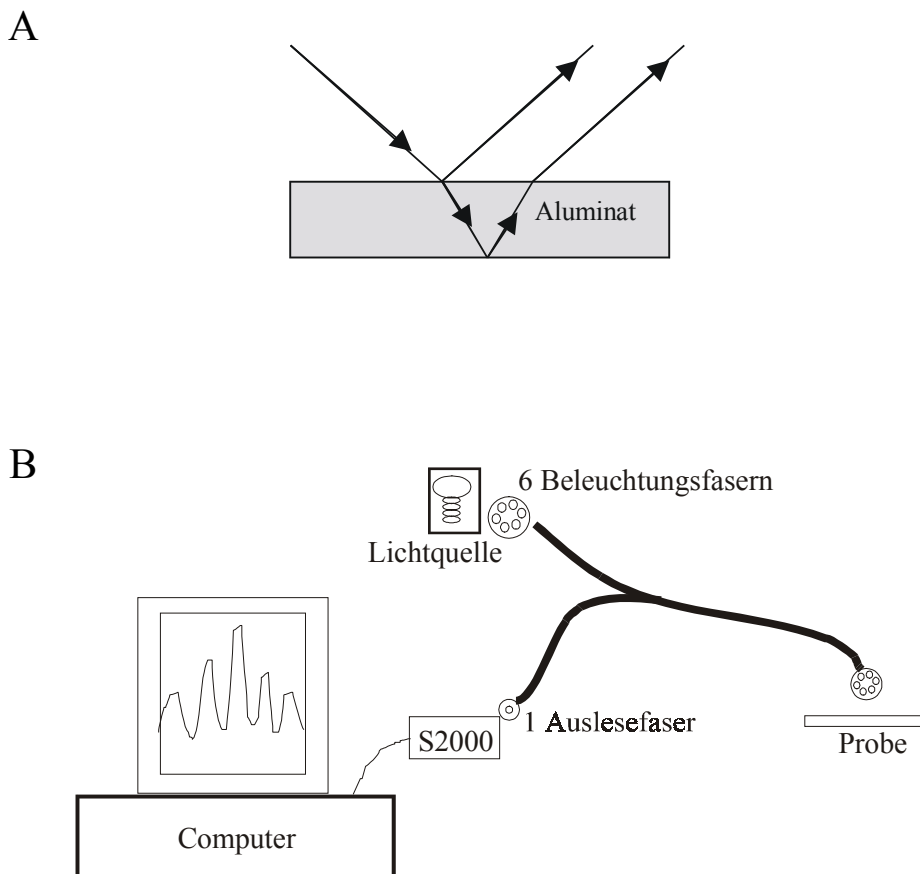


Abb. 3.6. A) Interferenzeffekte an dünnen Schichten: Der an der Oberfläche reflektierte Strahl interferiert mit dem an der Unterseite der dünnen Schicht reflektierten Strahl. B) Schematischer Aufbau des Interferometers. Das reflektierte Licht wird über einen Lichtleiter zum Spektrometer geleitet.

Wird hingegen weißes Licht eingestrahlt, ist die Interferenz wellenlängenabhängig, ein Interferenzspektrum ist die Folge [26]. Sind Brechungsindex n und Einfallswinkel konstant, so ist die Lage der Extrema eine Funktion der Schichtdicke d . Für senkrecht zur Oberfläche einfallendes Licht ergibt sich

$$m\lambda = 2nd \quad (3.9)$$

mit der Ordnung der Maxima m und der Wellenlänge λ des einfallenden Lichts. Mit zunehmender Schichtdicke verschiebt sich das Spektrum zu größeren Wellenlängen. In dieser Arbeit wurde ein *Ocean Optics S 1000* Interferometer (Dunedin, FL, USA) verwendet, der Aufbau ist in Abb. 3.6 B schematisch dargestellt. Das Licht einer Halogenlampe wird über einen Lichtleiter mit einer resultierenden Strahlgröße von etwa 1-2 mm auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Der Wellenlängenbereich des eingestrahlteten Lichts variiert im Bereich von 400 – 900 nm. Die Ausleuchtung und Detektion des Lichts werden entlang der Oberflächennormalen vollzogen. Das reflektierte Licht gelangt über einen Lichtleiter zum Spektrometer. Zur Normierung der Intensitätsverteilung des weißen Lichts dient das Reflektionsspektrum von einer Goldoberfläche. Die Datenerfassung und Auswertung wurde mit einem im Arbeitskreis geschriebenen Programm in *LabView* 6.0 durchgeführt.

3.3 Rasterkraftmikroskopie

Zur Untersuchung biologischer Proben in wässriger Umgebung hat sich die Rasterkraftmikroskopie (**Scanning Force Microscopy**, SFM) bewährt, die eine Auflösung von wenigen Nanometern erlaubt und damit die Abbildung einzelner Domänen in Lipidschichten und sogar in Proteinen ermöglicht. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der Elektronenmikroskopie besteht darin, keine leitenden Proben zu benötigen und diese nicht im Vakuum vermessen zu müssen, was die Präparation biologischer Proben erheblich erleichtert. Zudem befinden sie sich während der Messung in Wasser und somit in ihrer natürlichen Umgebung.

3.3.1 Grundlagen

Das Rasterkraftmikroskop wurde im Jahr 1986 von Binnig et al. [69] vorgestellt. Es gehört zu den Rastersondenmikroskopen, deren Entwicklung aus der Rastertunnelmikroskopie (STM) hervorging. Das Messprinzip des

Rasterkraftmikroskops basiert auf der Wechselwirkung einer in xy-Richtung über die Probe gerasterten Messspitze mit der Oberfläche. Diese Spitze ist an einem Federbalken (engl. *Cantilever*) befestigt, dessen Verbiegung ein Maß für die auftretende Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe darstellt. Die Detektion der Cantileverauslenkung kann über verschiedene Techniken erfolgen, wie die Interferometrie, die Piezoelektrizität, die Messung des Tunnelstroms oder die Veränderung der Kapazität. Die kommerzialisierte und damit vorwiegende Detektionsmethode beruht auf der Auslenkung eines auf der Cantilever-Rückseite reflektierten Laserstrahls (Abb. 3.8). Über eine positionsempfindliche Photodiode wird die Auslenkung detektiert und zusammen mit dem Raster zur Erzeugung von Abbildungen benutzt. Neben dem Fehlersignal (engl. *Deflection*) lassen sich auch laterale Verbiegungen des Federbalkens messen, aus denen Reibungskräfte ermittelt werden können. Die Federkonstanten der häufig aus Silizium oder Siliziumnitrid bestehenden Cantilever liegen üblicherweise bei 0.01 – 1 N/m, die Spitzenradien variieren zwischen 2 - 100 nm.

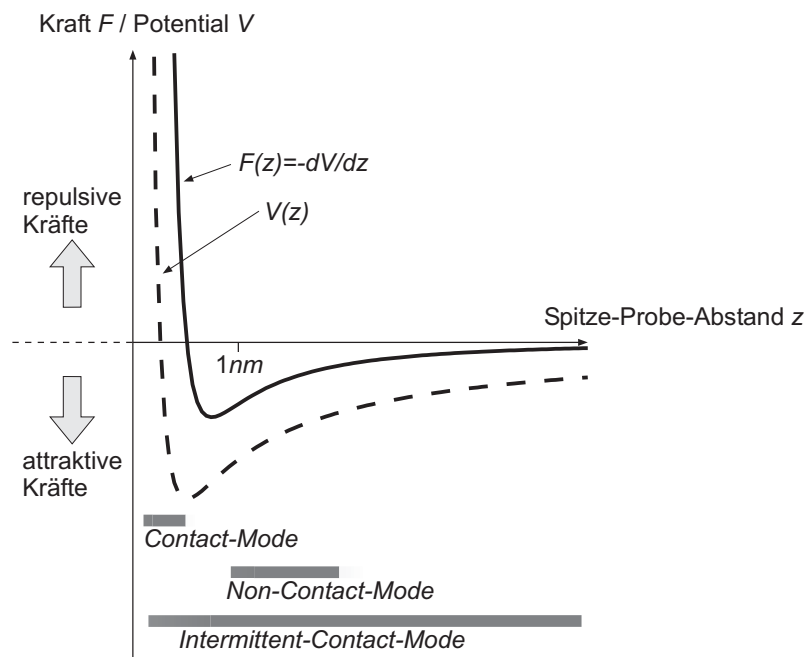


Abb. 3.7. Darstellung des Wechselwirkungspotentials $V(z)$ und der daraus abgeleiteten Kraft $F(z)$ als Funktion des Spitze-Probe-Abstands z . Gezeigt sind zudem die Arbeitsbereiche der verschiedenen Betriebsmodi. Quelle: [70]

Die jeweiligen Regelparameter bei der Abbildung einer Probe werden in den meisten Betriebsmodi über einen Rückkopplungsmechanismus konstant gehalten. Im *Contact-Mode* im *Constant Force*-Betrieb wird auf einen konstanten Wert der Kraft geregelt. Die Messspitze befindet sich in ständigem repulsiven Kontakt mit der Probe. 0 verdeutlicht dies anhand der typischen Verläufe des Wechselwirkungspotentials $V(z)$ und der sich daraus ergebenden Kraft

$$F(z) = -\frac{dV(z)}{dz} \quad (3.10)$$

als Funktion des Spitze-Probe-Abstands z . Im *Intermittent-Contact-Mode*⁵ wird üblicherweise die Amplitude oder Phase konstant gehalten. In diesem Betriebsmodus, der mit dem *Non-Contact-Mode* zu den dynamischen Betriebsmodi zählt, wird die Spitze durch eine externe Kraft zu oszillierenden Bewegungen angeregt. Sie berührt die Probe in einer Schwingungsperiode nur für kurze Zeit. Die genaue Kontaktzeit hängt von der Elastizität der untersuchten Probe ab. Der Cantilever durchläuft wie in 0 verdeutlicht während einer Oszillation sowohl attraktive als auch repulsive Bereiche des Wechselwirkungspotentials $V(z)$. Im *Non-Contact-Mode* oszilliert der Cantilever mit geringer Amplitude (< 10 nm) nur im attraktiven Potentialbereich.

Aufgrund der geringen Kontaktzeit der Spitze mit der Oberfläche und der Minimierung lateraler Scherkräfte arbeiten die dynamischen Betriebsmodi zerstörungsfreier als der *Contact-Mode*, der jedoch in der Regel eine höhere laterale Auflösung liefert.

3.3.2 Messaufbau

Der allgemeine Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops mit Lichtzeigerprinzip im dynamischen Modus ist in Abb. 3.8 dargestellt. Der Strahl einer Laserdiode wird an der Oberseite des Cantilevers reflektiert, der von einem Frequenzgenerator über ein Piezoelement zur Schwingung angeregt wird. Die Vierquadrantendiode detektiert die Position des reflektierten Lichtstrahls, die mit der momentanen Auslenkung des Cantilevers korreliert. Das detektierte Signal wird an einen Lock-In-Verstärker weitergegeben, mit dem die relative Änderung der Amplitude und Phase zum Anregungssignal bestimmt wird. In dem in Abb. 3.8 gezeigten Aufbau wird die Probe über eine xyz-Rasterelektronik bewegt, oftmals finden sich jedoch auf Aufbauten, in denen der Messkopf bestehend aus Cantilever und Anregungspiezoelementelement gerastert wird.

⁵ Der *Intermittent-Contact-Mode* wird häufig auch als *Tapping-Mode* bezeichnet.

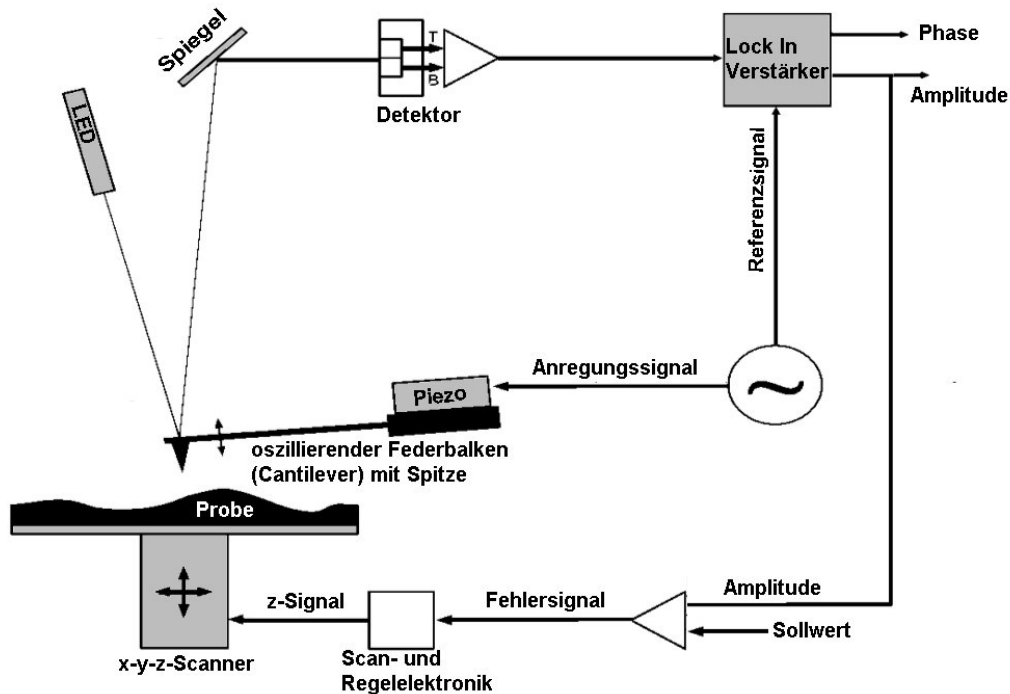


Abb. 3.8. Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops im dynamischen Modus. Die Abkürzung LED bezeichnet die Leuchtdiode. Quelle: [70]

3.4 Quarzmikrowaage

Viele wichtige physikalische und chemische Prozesse gehen mit einer Massenänderung einher und können über diese mittels einer Quarzmikrowaage detektiert werden. So lassen sich nicht nur Informationen über Bindungsereignisse an Oberflächen, sondern auch materialspezifische Größen wie Oberflächenladungszustände und Viskosität erhalten.

Das theoretische Fundament für diese Technik wurde im Jahr 1885 von Raleigh mit der Entdeckung der Piezoelektrizität gelegt [71], die ersten Untersuchungen führten Jacques und Pierre Curie jedoch schon im Jahr 1880 durch [72]. Eine Bedeutung in der Analytik kam der Quarzmikrowaage allerdings erst zu, als es gelang, einen linearen Zusammenhang zwischen Massenabscheidung und Frequenzänderung

aufzustellen [73]. Mit der Möglichkeit, Quarze auch unter Flüssigkeiten zu betreiben, eröffneten sich auch in der biochemischen Forschung zahlreiche Anwendungen.

3.4.1 Grundlagen

Die Technik der Quarzmikrowaage (*quartz crystal microbalance*, QCM) basiert auf dem inversen piezoelektrischen Effekt, der bei Kristallen ohne Punktsymmetriezentrum auftritt. Die Besonderheit eines piezoelektrischen Materials liegt in der Erzeugung einer Potentialdifferenz zwischen den Oberflächen eines Kristalls beim Aufbringen einer mechanischen Spannung. Der inverse piezoelektrische Prozess besteht in einer spezifischen mechanischen Deformation, wenn zwischen den Kristalloberflächen eine Spannung angelegt wird. Der für QCM-Messungen verwendete α -Quarz weist einen solchen inversen piezoelektrischen Effekt auf. Wird das System mit einer Wechselspannung angeregt, so tritt durch die Reaktion der Atome auf die wechselnde Polarisierung eine Schwingung im Quarz auf. Die jeweils auftretende Schwingungsform hängt vom Schnittwinkel ab, mit dem das Quarzplättchen aus dem nativen α -Quarz geschnitten wurde. Die in der QCM-Technik verwendeten Quarze werden im AT-Schnittwinkel von $35^\circ 10'$ zur optischen Achse aus dem Quarz herausgeschnitten (*AT-cut* Quarz) und gehören zu den Dickenscherswingern (Abb. 3.9) [74]. Der Temperaturkoeffizient der AT-cut Quarze ist zwischen 0 und 50°C nahezu Null.

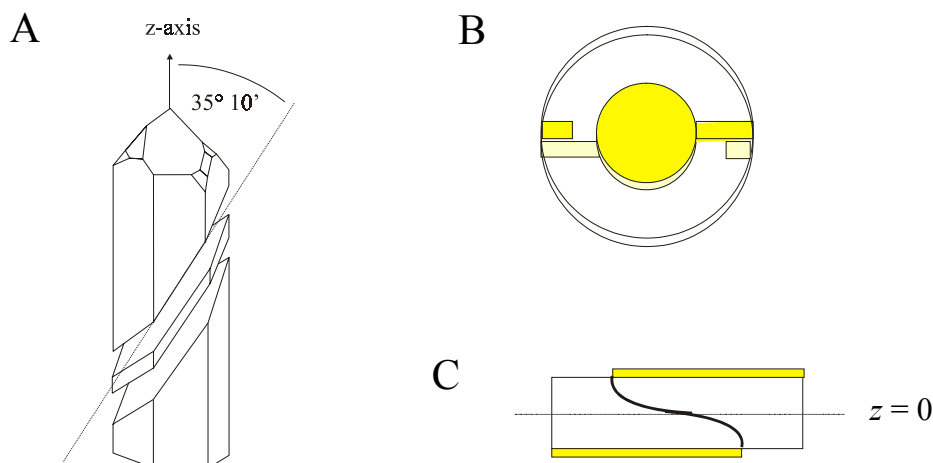


Abb. 3.9. A) Darstellung der AT-Schneitebene im Quarz. B) Goldelektroden (grau) auf einem AT-cut Quarz. C) Grundschiebung einer Dickenscherschwingung eines AT-cut Quarzes.

Die Eigenschaften der Dickenscherschwungung erlauben eine quantitative Detektion sehr kleiner Massenänderungen, da die entsprechende Resonanzfrequenz von der Dicke des Quarzes abhängt, die genau einer halben Wellenlänge entspricht. Die Resonanzfrequenz f_0 kann berechnet werden über:

$$f_0 = \frac{1}{2d_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \quad (3.11)$$

mit dem Schermodul μ_q , der Dichte ρ_q und der Dicke d_q des Quarzes.⁶

Nach Sauerbrey gilt, dass eine Massenänderung Δm auf dem Quarz zu einer Dickenänderung Δd und Resonanzfrequenzänderung Δf führt [73]:

$$\Delta f = -\frac{f_0 \Delta d}{d_q} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C_f \Delta m \quad (3.12)$$

Diese lineare Beziehung zwischen Massen- und Dickenveränderung setzt voraus, dass die Dichte der angelagerten Masse und des Quarzes übereinstimmen, die Masse fest und gleichmäßig auf der Elektrodenfläche A verteilt ist und die Massenbeladung 0.5 % der ursprünglichen Quarzmasse nicht übersteigt [75]. Streng genommen gilt diese Beziehung nur für Messungen in der Gasphase. Liegt hingegen die Überschichtung einer Quarzseite mit einer Newtonschen Flüssigkeit vor, pflanzt sich die Schwerwelle in die Flüssigkeit hinein fort, wo sie je nach Dichte ρ_l und Viskosität η_l eine unterschiedlich starke Dämpfung erfährt. Aus der einhüllenden Exponentialfunktion der gedämpften Welle lässt sich die Eindringtiefe der Welle in die Flüssigkeit bestimmen. Für die Änderung der Resonanzfrequenz bei einer Massenablagerung in Flüssigkeiten ergibt sich ohne Berücksichtigung von Energieverlusten [76]:

$$\Delta f = f_0^{3/2} \left(\frac{\eta_l \rho_l}{\pi \mu_q \rho_q} \right)^{1/2} \quad (3.13)$$

3.4.2 Messaufbau

Der verwendete Messaufbau ist in Abb. 3.10 schematisch dargestellt. Ein 5 MHz *AT-cut* Quarz wird in eine Teflonkammer eingespannt und mit Flüssigkeit überschichtet. Um die Beeinflussung der Schwingung möglichst gering zu halten, werden die zwei zur Abdichtung der Quarzkammer benötigten Dichtringe am Rand des Quarzes platziert. Die Elektroden sind mit Goldzuleitungen an der Unterseite des Quarzes leitend verbunden und werden dort über Federkontakte an einen Oszillatorschaltkreis

⁶ Für einen 5 MHz *AT-cut* Quarz können folgende Werte angenommen werden: $d_q = 0.33$ mm, $\mu_q = 2.947 \cdot 10^{10}$ N/m² und $\rho_q = 2651$ kg/m³.

angeschlossen. Durch den Oszillator, der mit einer Spannungsquelle verbunden ist, wird der Quarz zu Schwingungen angeregt, gleichzeitig wird seine Resonanzfrequenz mittels eines Frequenzzählers ausgelesen. Durch eine serielle Schnittstelle wird die ermittelte Resonanzfrequenz an den Computer weitergegeben, wo sie aufgezeichnet und zeitlich dargestellt wird.

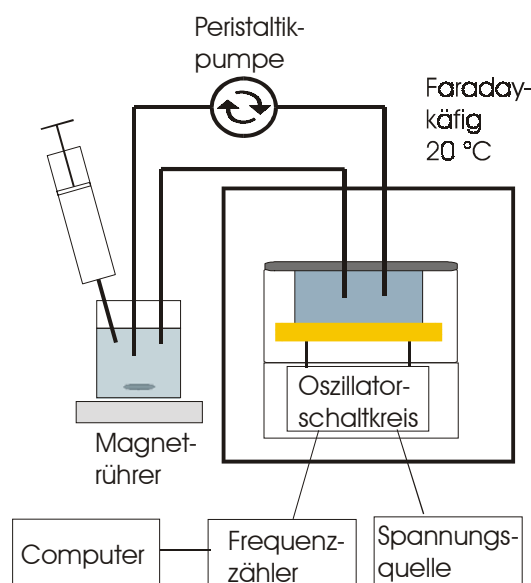


Abb. 3.10. Schematischer Aufbau der Quarzmikrowaage-Apparatur. Der Quarz wird in eine Teflonkammer eingespannt und mit einem Oszillatorschaltkreis an einer Spannungsquelle verbunden. Über einen Frequenzzähler wird die Resonanzfrequenz an einen Computer weitergegeben. Die Zugabe von Lösungen erfolgt über ein externes Gefäß, das über einen geschlossenen Flüssigkeitskreislauf mit der Quarzkammer verbunden ist. Quelle: [77]

Die Zugabe von Lösungen in die Messkammer erfolgt über ein externes Gefäß, das über einen geschlossenen Flüssigkeitskreislauf mit der Messkammer verbunden ist. Eine Peristaltikpumpe sorgt für ein gleichmäßiges Zirkulieren der Flüssigkeit. Zur Regulierung der Temperatur befinden sich sowohl die Messkammer als auch der Oszillatorschaltkreis in einem auf 20 °C temperierten Faradaykäfig aus Messing. Um mechanische Störungen zu minimieren, steht der Aufbau auf einem gedämpften Tisch.

4 Präparation

4.1 Auswahl des Substrats

Um eine Untersuchung von porenüberspannenden Membranen zu ermöglichen, sollte das verwendete poröse Substrat elektrochemischen und oberflächenanalytischen Verfahren zugänglich sein. Zudem sollte es eine hohe chemische und mechanische Stabilität aufweisen, die Porengrößen sollten über einen weiten Bereich einstellbar sein und es sollte möglich sein, die Oberfläche über gut reproduzierbare *self-assembly*-Techniken selektiv zu funktionalisieren.

Es sind eine Reihe von Verfahren beschrieben, die es ermöglichen, Lochstrukturen in festen Substraten zu erzeugen. Höppener und Augustin et al. stellten Glimmersubstrate mit durchgehenden Lochstrukturen her, indem sie die Glimmoberflächen mit Schwerionen beschossen [78, 79]. Die durch den Beschuss entstandenen atomaren Störungen wurden mit Flusssäure auf den gewünschten Lochdurchmesser erweitert. Die erhaltenen Substrate sind gut geeignet für Anwendungen und Nachweisverfahren, die eine atomar glatte Oberfläche erfordern, sind elektrochemischen Nachweismethoden jedoch nicht zugänglich. Zudem existieren in Europa zur Zeit nur zwei Strahlquellen für Schwerionen ausreichender Energie, wodurch sich die Präparation dieser Substrate als recht aufwendig erweist.

Ein weiteres mögliches Substrat ist Silizium, dessen Mikrostrukturierung aus der Chiptechnologie bekannt ist [80]. Silizium ist elektrochemischen und oberflächenanalytischen Verfahren zugänglich. Die Porengrößen können prinzipiell über den Dotierungsgrad, die eingesetzte Säurekonzentration und die Anodisierungsspannung variiert werden. Die genauen Zusammenhänge des Anodisierungsprozesses sind davon abhängig, ob p- oder n-dotiertes Silizium vorliegt. Der Dotierungsgrad ist jedoch nur in einem gewissen Rahmen einstellbar, was gerade bei hohen Dotierungsgraden die Reproduzierbarkeit vermindert. Silizium ist ohne eine Siliziumdioxid-Schicht in wässriger Lösung nicht stabil und weist somit ohne Oxidation oder Oberflächenfunktionalisierung keine ausreichende chemische Stabilität auf [81]. Zudem kann im Fall von n-dotiertem porösem Silizium nicht davon ausgegangen werden, dass die entstehenden Poren zylinderförmig sind. Gösele und Arbeitsgruppe untersuchten die Herstellung hochgeordneter poröser Aluminate

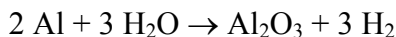
[82-86]. Sie wiesen eine direkte Einstellbarkeit sowohl der Porentiefe als auch der Porendurchmesser im Bereich von 10 nm bis 400 nm nach. Aufgrund der nativen Oxidschicht weist Aluminium eine gute chemische Stabilität in wässrigen Lösungen auf und bietet eine annähernd zylinderförmige Porenform [86]. Aufgrund der Leitfähigkeit des Aluminiums und der kapazitiven Eigenschaften des Aluminats [87] ist das Substrat prinzipiell der elektrischen Impedanzspektroskopie zugänglich.

Da die porösen Aluminate die an das Material gestellten Anforderungen weitestgehend erfüllen, wurden sie in dieser Arbeit als Substrat für die porenüberspannenden Lipiddoppelschichten verwendet.

4.2 Herstellung von Aluminatsubstraten

4.2.1 Grundlagen der Herstellung poröser Aluminate

An Luft und in wässrigem Medium ist Aluminium mit einer dünnen nativen Oxidschicht belegt. Diese Schicht entsteht durch die Reaktion:



mit einer freien Enthalpie von -864,6 kJ/mol [86]. Durch die Bildung des Oxids werden die Reaktionspartner voneinander getrennt, so dass die Reaktion zum Erliegen kommt (Passivierung). Der Ladungstransport kann jedoch über das Anlegen einer äußeren Spannung an das Aluminium aufrecht erhalten werden. Es finden dabei folgende Reaktionen statt:



An der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche kommt es zur Reduktion von Protonen, während an der Metall/Oxid-Grenzfläche die Oxidation von Al zu Al^{3+} stattfindet. Das gebildete Al^{3+} führt entweder zur Oxidbildung mit den an die Metall/Oxid-Grenzfläche gedrifteten O^{2-} bzw. OH^- -Ionen oder es driftet aufgrund des angelegten Feldes zur Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche.

Je nach verwendetem Elektrolyten, Temperatur und Stromstärke bildet sich entweder ein massives Barriereoxid oder eine poröse Struktur aus: In Elektrolyten, die das entstehende Oxid nicht angreifen, entsteht ein Barriereoxid. Der genaue

Entstehungsprozess wird in Kapitel 4.2.3 näher erläutert. Findet die Anodisierung hingegen in einem Elektrolyten statt, der das gebildete Oxid langsam auflöst, entstehen poröse Strukturen im Aluminat. Die Bildung des Oxids findet in diesem Fall fast ausschließlich an der Metall/Oxid-Grenzfläche statt. Zwar wandern die Al^{3+} -Ionen auch durch das Oxid, werden aber an der Grenzfläche direkt an den Elektrolyten abgegeben, ohne zur Oxidbildung beizutragen. Die Stromeffizienz beträgt daher nur etwa 60 %.

Die Poren wachsen senkrecht zur Oberfläche, es entsteht ein Gleichgewicht zwischen der Auflösung des Oxids an der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche und der Bildung neuen Oxids an der Metall/Oxid-Grenzfläche. Die Abläufe, die zur Bildung der Poren führen, sowie der resultierende Stromverlauf sind in Abb. 4.1 und Abb. 4.2 gezeigt. Zunächst bildet sich auch bei der Entstehung poröser Substrate eine Barrierschicht aus, die eine Abnahme des Stromflusses auf einen Bruchteil des Anfangswertes zur Folge hat (Phase 1). Aufgrund von Inhomogenitäten im Aluminium kommt es zu Fluktuationen in der Dicke des gebildeten Barriereoxids. An den Vertiefungen weist das \vec{E} -Feld eine höhere lokale Feldstärke auf, die durch die Polarisierung der Al-O-Bindungen eine schnellere Auflösung des Oxids zur Folge hat (Phase 2).

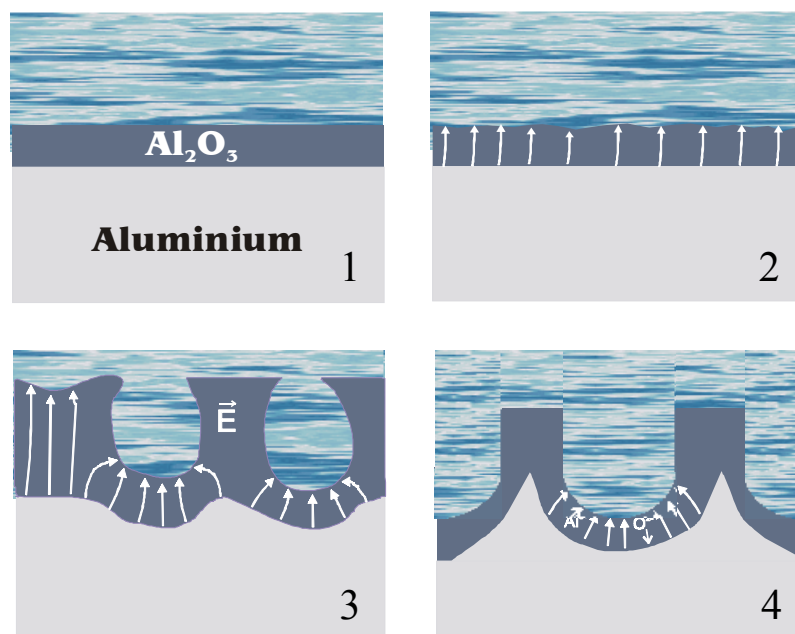


Abb. 4.1. Kinetik des Porenwachstums: 1. Wachstum eines Barriereoxids, 2. Entstehung von Vertiefungen, 3. Bildung der ersten Poren, 4. Porenwachstum.

Andererseits bewirkt die erhöhte Feldstärke auch einen höheren Ionenfluss, so dass neben einer schnelleren Auflösung des Oxids auch eine schnellere Bildung auftritt. Die bestehenden Vertiefungen werden also nicht ausgeglichen wie bei der Bildung eines Barriereoxids, sondern verstärkt und können somit der Porenbildung als Keime dienen. Die erhöhte Ionendrift bewirkt ein Ansteigen des Stromes (Phase 3), das solange andauert, bis die gesamte Substratoberfläche mit Poren bedeckt ist und die Poren sich gegenseitig in ihrem horizontalen Wachstum beschränken. Das anschließende Wachstum ist von einem Gleichgewicht zwischen Bildung und Auflösung des Oxids an den Oxid/Elektrolyt-Grenzflächen an den Porenböden gekennzeichnet (Phase 4). Dieser Gleichgewichtszustand wird im nahezu konstanten Stromverlauf deutlich. Die leichte Abnahme des Stromes über einen längeren Zeitraum ist auf eine chemische Veränderung des Elektrolyten in den Poren durch den Einbau von Sauerstoff sowie die Freisetzung von Al^{3+} zurückzuführen [86].

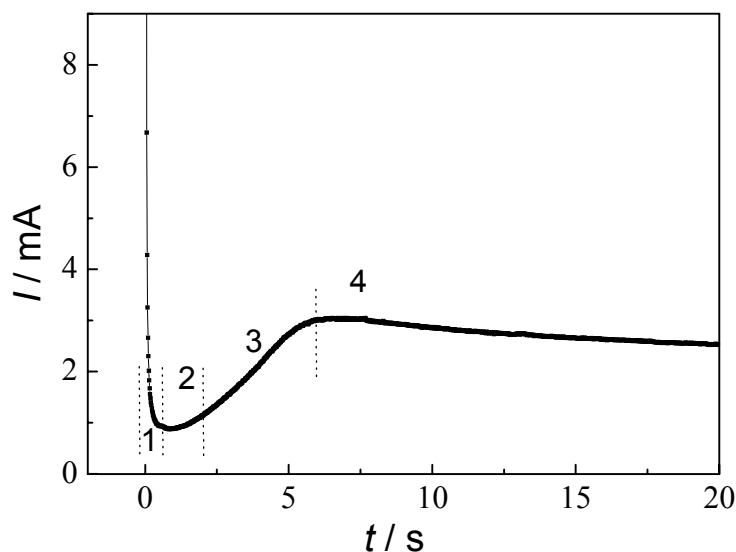


Abb. 4.2. Resultierender Stromverlauf beim Anodisierungsprozess von Aluminium in 0.3 M Oxalsäure.

Das entstehende Aluminiumoxid besteht aus amorphem oder polykristallinem γ - Al_2O_3 . Der Wassergehalt ist immer noch Gegenstand von Diskussionen, die gefundenen Werte variieren zwischen 0 % und äquimolaren Mengen [87, 88]. Dagegen ist bekannt, dass die Oxide während der Anodisierung Ionen aus der Elektrolytlösung inkorporieren, im Falle der Oxalsäure wurden Werte von 3 - 8 % Oxalat gefunden [89]. Eine Übersicht über diesen Prozess findet sich in [88], [87] und [86].

Vor einigen Jahren gelang es erstmals, hexagonal geordnete poröse Strukturen in Aluminium zu erzeugen [90]. Dabei zeigen die Porenanordnungen polykristalline Strukturen, die geordnete Domänen von einigen Mikrometern aufweisen [83]. Für das Auftreten geordneter Strukturen werden die zwischen benachbarten Poren auftretenden Kräfte verantwortlich gemacht. Im Laufe des Anodisierungsprozesses geht das anfänglich ungeordnete Porenwachstum daher in ein geordnetes über. Um geordnete Porenstrukturen zu erhalten, wird die in einem ersten Anodisierungsprozess erhaltene poröse Schicht vom Aluminium abgelöst, das Aluminium erhält so eine hexagonal geordnete Vorstrukturierung. Diese bereits vorgegebenen Vertiefungen bilden die Keime für die Porenbildung im zweiten Anodisierungsprozess. Eine mögliche Ursache für diese Kräfte ist der mechanische Stress, der durch die Expansion während des Oxidwachstums an der Metall/Oxid-Grenzfläche hervorgerufen wird [85]. Da die atomare Dichte des Aluminiums im Oxid um einen Faktor zwei kleiner ist als im metallischen Aluminium und die Oxidbildung am kompletten Porenboden simultan abläuft, kann das Material sich nur in vertikaler Richtung ausbreiten, so dass die existierenden Porenwände nach oben gedrückt werden. Die Expansion des Aluminiums unter der Anodisierung führt zu etwas weniger als dem doppelten Original-Volumen, abhängig von den jeweiligen experimentellen Bedingungen.

Anodisierungsparameter

Die Attraktivität der porösen Aluminate liegt zum Teil darin begründet, dass die Eigenschaften der Poren durch die Wahl der Anodisierungsparameter an die jeweilige Anwendung angepasst werden können. So weist die Dicke der porösen Schicht eine lineare Abhängigkeit von der Anodisierungsdauer auf, im Fall von Oxalsäure und einer Anodisierungsspannung von 40 V liegt die das Porenwachstum bei etwa 2 $\mu\text{m/h}$ [85]. Hingegen bleibt die Schichtdicke des Oxids an den Porenböden zeitlich konstant. Sie kann über die angelegte Spannung variiert werden. Die entstehende Dicke des Oxids beträgt 1.3 nm/V [82]. Neben der Dicke der Barrierschicht weisen auch Porenabstände sowie Porendurchmesser eine proportionale Abhängigkeit zur angelegten Anodisierungsspannung auf. Der Abstand der Poren wächst linear mit der angelegten Spannung und beträgt 2.6 nm/V [82]. Li et al. gelang es, diesen Abstand zwischen 50 nm und 420 nm zu variieren [83, 84]. Die bislang erreichten Porendurchmesser liegen im Bereich von 10 nm und 400 nm.

4.2.2 Herstellung poröser Aluminate

Die Herstellung der porösen Aluminate beinhaltet das Tempern und Elektropolieren als Vorbehandlung, den Anodisierungsprozess sowie je nach Anwendung das Aufweiten bzw. Ausdünnen der Poren.

Elektrochemisches Polieren

Hochreine Aluminiumfolien (Goodfellow, 99.999 %, Dicke 0.5 mm, $2 \times 2 \text{ cm}^2$) wurden zunächst für 3 Stunden bei 500 °C ausgeheizt, um die Korngrößen des polykristallinen Aluminiums zu erhöhen und damit die Korngrenzen zu vergrößern, die ein regelmäßiges Porenwachstum stören würden. Zur Glättung der Oberfläche wurden die Substrate dreimal für etwa 40 Sekunden bei einer Temperatur von 70 °C und einer Spannung von 20 V elektropoliert⁷. Als saurer Elektrolyt diente ein Schwefelsäure/Phosphorsäure/Wasser-Gemisch im Massenverhältnis 2:2:1. Direkt nach dem Entfernen des Elektrolyten wurden die Proben gründlich mit Wasser gespült.

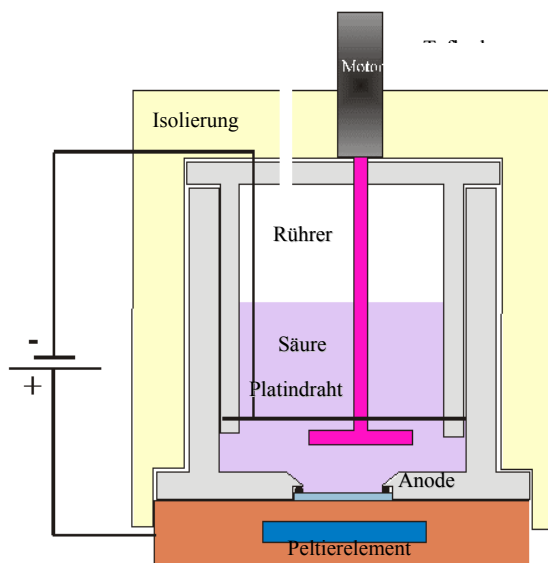


Abb. 4.3. Schematische Darstellung der Apparatur zur Herstellung poröser Aluminate. Das Aluminium wird als Anode in die Kammer eingespannt, ein Platindraht dient als Kathode. Das Temperieren erfolgt über eine Peltierelement, eine Styropor-Ummantelung isoliert die Reaktionskammer. Der Rührer wird über einen außerhalb dieser Zelle befestigten Motor bewegt.

⁷ Greift der Elektrolyt das gebildete Oxid mit einer hohen Auflösungsrate an, so kommt es zum Prozess des Elektropolierens. Unebenheiten werden hierbei nicht verstärkt, sondern ausgeglichen. Bisher ist dieser Vorgang allerdings noch nicht im Detail aufgeklärt.

Herstellung ungeordneter Poren

Ungeordnete Poren wurden in einem einstufigen Anodisierungsprozess erhalten, der in 0.3 M wässriger Oxalsäure bei 2 °C und 40 V über mehrere Stunden durchgeführt wurde. Die elektropolierten Aluminiumträger wurden hierzu in die in Abb. 4.3 dargestellte Apparatur eingebaut. Ein Rührer gewährleistet, dass sich die chemische Zusammensetzung des Elektrolyten an der Probenoberfläche nicht ändert. Ein regelbares Peltierelement mit einem daran angeschlossenen Kühlwasserkreislauf ermöglicht das Temperieren der Reaktionskammer.

Nach dem Anodisierungsprozess wurden die Proben mit Reinstwasser gespült, um Säurereste zu entfernen. Zur Kontrolle des Anodisierungsprozesses erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung des Stromverlaufs.

Herstellung geordneter Poren

Die Herstellung hexagonal geordneter Poren erfolgte über einen zweistufigen Anodisierungsprozess. Im ersten Schritt wurden die Proben wie oben beschrieben für mehrere Stunden bei 40 V anodisiert. In einem Zwischenschritt folgte die Ablösung des gebildeten, porösen Oxids in einer gerührten sauren, wässrigen Chrom(VI)oxid-Lösung (1,8 w% CrO₃ und 7,06 w% H₃PO₄) bei 70 °C über mehrere Stunden, gefolgt von gründlichem Spülen in H₂O. Die Probe besaß anschließend eine hexagonal geordnete Vorstrukturierung. Bei einem zweiten Anodisierungsprozess, der unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde wie der erste, wurden diese Vorstrukturierungen über einige Stunden zu Poren vertieft.

Aufweiten der Poren

Je nach Anwendung wurden die erhaltenen porösen Aluminate in einem anschließenden Schritt entweder aufgeweitet oder ausgedünnt⁸. Der Prozess des chemischen Aufweitens bestand im 3-stündigen Lagern der Proben in 0.3 M Oxalsäure bei einer Temperatur von 30 °C. Anschließend wurden die Proben mit Reinstwasser gespült.

Ausdünnen der Porenböden

Zur Verringerung der Dicke der Oxidschicht an den Porenböden wurde in Anschluss an die Anodisierung ein Ausdünnprozess durchgeführt. Hierzu wurde eine exponentiell abfallende Spannung an die Proben mit einer Zeitkonstanten von 40 Minuten angelegt [82]. Die Startspannung wurde durch die Anodisierungsspannung gegeben und betrug 40 V, die Endspannung lag bei 40 mV. Abb. 4.4 zeigt den

⁸ Eine Probe sollte jedoch nicht beiden Prozessen unterzogen werden, da dies ein Ineinanderwachsen der Poren zur Folge hat und eine definierte Porosität nicht mehr gewährleistet werden kann.

Spannungs- und Stromverlauf beim Ausdünnpzess eines porösen Aluminatsubstrats. Wie bei der Anodisierung diente 0.3 M Oxalsäure als Elektrolyt, die Temperatur betrug 2 °C. Anschließend wurden die Proben sofort mit Reinstwasser gespült, um Säurereste zu entfernen.

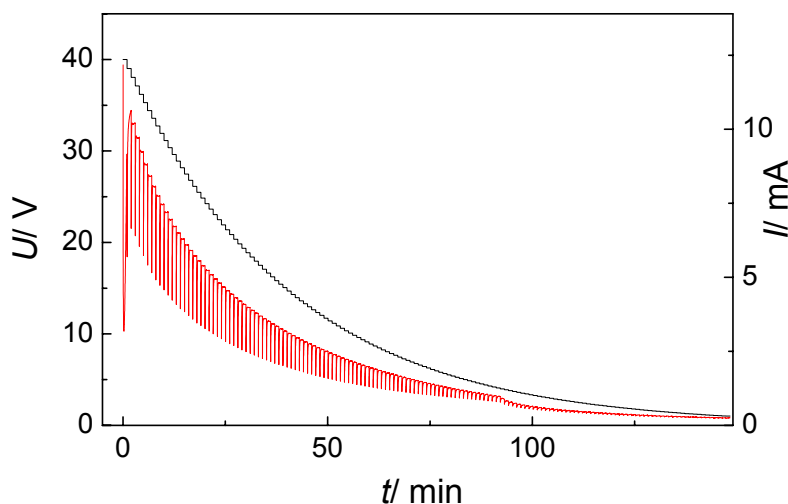


Abb. 4.4. Spannungs- und Stromverlauf beim Ausdünnpzess in 0.3 M Oxalsäure.

Beschichtung der porösen Aluminate mit Gold

Die Proben wurden zunächst für 5 Minuten im Argon-Plasma gereinigt. In einem *Sputter Coater 108 auto* der Firma Cressington wurde das Substrat mit 25 nm Gold belegt. Die Messung der aufgetragenen Schichtdicke erfolgte über einen Schwingquarz, der sich in der Probenkammer befindet. Da nur die obere Oberfläche des porösen Substrates mit Gold beschichtet werden sollte, erfolgte das Aufbringen des Goldes unter senkrechtem Winkel. Die eventuell auftretende Belegung des Porenbodens mit Gold hat keinen Einfluss auf die durchgeführten Experimente, da die Vesikel durch Größenausschluss nicht in die Poren diffundieren können. Das Aufbringen des Goldes unter einem anderen Winkel würde jedoch die Belegung des oberen Porenrandes mit Gold beinhalten, was eine direkte Beeinflussung der Membranpräparation zur Folge hätte.

4.2.3 Grundlagen der Herstellung planarer Aluminate

Wird der oben beschriebene Ätzprozess in einem Elektrolyten durchgeführt, der das entstehende Oxid nicht angreift, bildet sich ein massives Barriereoxid aus. Dieses wächst solange, bis die angelegte Spannung nicht mehr ausreicht, um einen

Ionen transport über das Oxid zu ermöglichen, d.h. die Oxidation des Aluminiums kommt zum Erliegen. Das Wachstum des Oxids findet dabei im Gegensatz zu der Oxidbildung im Fall poröser Aluminate sowohl an der Oxid/ Elektrolyt-Grenzschicht als auch an der Grenzschicht zwischen Metall und Oxid statt. An der Elektrolyt-Grenzschicht beruht dieses Wachstum auf dem Transport von Al^{3+} -Ionen, an der Metall-Grenzschicht auf dem Transport auf $\text{O}^{2-}/\text{OH}^-$ -Ionen. Die Stromeffizienz, die zur Bildung des Oxids führt, beträgt im Fall der planaren Oxide also etwa 100 % [86]. Entstehende Unebenheiten in der anfänglichen Barrierschicht werden nicht wie im Fall der porösen Aluminate verstärkt, sondern ausgeglichen. Eine detaillierte Beschreibung dieses Herstellungs-Prozesses findet sich in [87, 88].

4.2.4 Herstellung planarer Aluminate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die planaren Aluminiumoxide auf zwei verschiedene Arten hergestellt. In einer Vorbehandlung wurden die Aluminate für beide Herstellungsverfahren zunächst wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben elektropoliert. Bei der ersten Methode wurde die Anodisierung wie im Falle der porösen Aluminate in 0.3 M Oxalsäure bei einer angelegten Spannung von 40 V gestartet, jedoch beim Erreichen des Minimums der Stromkurve (Abb. 4.2) gestoppt. Es kann angenommen werden, dass die erreichte Dicke der planaren Oxidschicht in etwa der des Oxids an den Porenböden des porösen Aluminats entspricht.

Im zweiten Herstellungsverfahren wurde das Aluminium bei Raumtemperatur in 0.3 M Borsäure anodisiert, der Strom wurde auf einen Wert von 0.1 A limitiert. Der Strom folgt einem exponentiellen Abfall und erreicht innerhalb von 60 - 120 Sekunden annähernd den Wert null. Die resultierende Schichtdicke des planaren Barrierelayers beträgt 1.2 – 1.7 nm/V, wobei 1.4 nm/V der in der Literatur am häufigsten genannte Wert für die Dicke von in Borsäure hergestelltem Aluminiumoxid ist [91].

4.3 Herstellung von Goldelektroden

Für die Herstellung von Goldelektroden wurden Glasobjektträger verwendet, die bei einer Temperatur von 70 °C in wässriger Detergenzlösung (5 % (v/v) Mucosol) für 15 Minuten in einem Ultraschallbad gereinigt und anschließend mit Reinstwasser gespült wurden. Anschließend wurden die Objektträger im Stickstoffstrom getrocknet und für 5 Minuten im Argonplasma gereinigt. Die Beschichtung mit

Chrom und Gold wurde in einer Aufdampfanlage vom Typ E306 der Firma Edwards durchgeführt. Die Glasobjektträger wurden in eine Kupferschablone gespannt, die das Aufdampfen kreisrunder Goldelektroden mit einer Fläche von je 0.13 cm^2 ermöglicht. Das Hochvakuum in der Aufdampfanlage, das einen Wert von 10^{-8} bis 10^{-9} bar erreicht, wurde über eine dreistufige Öldiffusionspumpe erzeugt. Durch thermische Verdampfung wurden zunächst 5 – 10 nm Chrom und anschließend 100 nm Gold aufgedampft. Dies ist aufgrund eines mechanischen Drehtellers zur Wahl des Aufdampfmaterials ohne Belüftung möglich. Die Dicke der aufgedampften Schichten wurde über die Änderung der Resonanzfrequenz eines in die Apparatur eingebauten Schwingquarzes gemessen.

Zur Reinigung der Goldelektroden von chemisorbierten Thiolschichten wurde die Goldelektrode für 5 Minuten in einer $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ heißen Mischung aus 75 % (v/v) konzentrierter Schwefelsäure und 25 % (v/v) Wasserstoffperoxid (30 %ig) inkubiert. Anschließend wurden die Elektroden in Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

4.4 Präparation von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten

4.4.1 Präparation von *Self-Assembly*-Schichten

Die goldbeschichteten Substrate wurden zunächst für 5 Minuten im Argonplasma gereinigt.

Die Funktionalisierung der Goldflächen der porösen Aluminate mit 3-Mercaptopropionsäure (3-Mercaptopropionic acid, MPA, $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) erfolgte über 60-minütige Inkubation in einer 1 mM wässrigen MPA-Lösung. Zur Beseitigung nicht adsorbierter Moleküle wurde die Probe mehrmals mit Reinstwasser und 10 mM Tris/ H_2SO_4 , pH 8.6 gespült.

Die Funktionalisierung der Goldoberflächen mit Mercaptoethylamin (MEA, $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) erfolgte über 60-minütige Inkubation in einer 1 mM wässrigen MEA-Lösung. Anschließend wurde die Probe mit 5 mM Bis-Tris/ H_2SO_4 , pH 5.6 gespült.

Die Funktionalisierung mit 11-Amino-undecanthiol (MUA, $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-NH}_2$) erfolgte über 24-stündige Inkubation in einer 0.5 mM ethanolischen Lösung. Anschließend wurde die Oberfläche mit Ethanol und 10 mM MES/NaOH, pH 5.0 gespült.

Der pK_s -Wert der Säurefunktion liegt bei einem Wert von 4.5, der der Amingruppe bei einem Wert von etwa 10. Die pH-Werte der verwendeten Puffer wurden so eingestellt, dass über 99 % der Moleküle im deprotonierten bzw. protonierten Zustand vorliegen.

4.4.2 Präparation von Polyelektrolytschichten

Das mit MEA funktionalisierte Substrat wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten in einer 0.12 mM wässrigen Lösung von negativ geladenem **Polystyrolsulfonat** (PSS, $M_w = 70000$ g/mol) inkubiert, gefolgt von einer 15 minütigen Inkubation in einer 4 mM wässrigen Lösung des Polyelektrolyten **Polyethylenimin** (PEI, $M_w = 600$ g/mol). Der pH-Wert beider Polyelektrolytlösungen wurde auf einen Wert von 5.6 eingestellt, um eine ausreichende Ladung der PEI- und der MEA-Schicht zu gewährleisten. Die beiden letzten Schritte wurden insgesamt fünf mal wiederholt, so dass sich 12 Polyelektrolytschichten auf dem Substrat befanden. Die zuletzt aufgebrauchte Schicht wurde in 0.5 - 2 M NaCl bzw. Na_2SO_4 präpariert⁹. Nach jedem Präparationsschritt folgte gründliches Spülen mit H_2O , um ein Auspolymerisieren der Polyelektrolyte in der Lösung zu vermeiden. Nach der Präparation wurden die Polyelektrolytschichten für 4 Stunden an Luft getrocknet. Abb. 4.5 zeigt die Strukturformeln der verwendeten Polyelektrolyte.

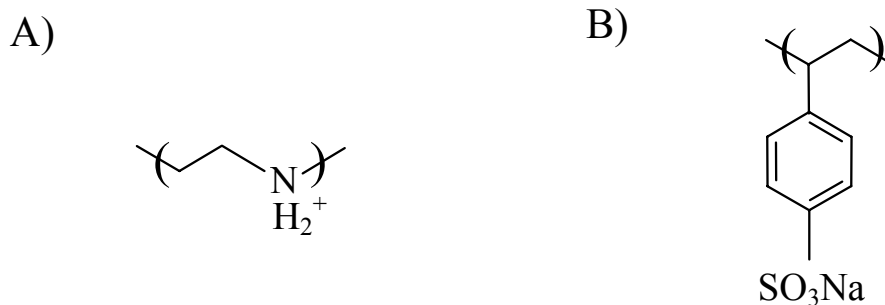


Abb. 4.5. Strukturformel von A) Polyethylenimin (PEI) und B) Polystyrolsulfonat (PSS).

⁹ NaCl wurde nur im Fall von Goldelektroden verwendet, da poröse Aluminate durch Halogenide irreversibel verändert werden.

4.4.3 Präparation von Vesikeln

Extrusionsmethode

Es wurden Stammlösungen der entsprechenden Lipide mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Chloroform/Methanol 1:1 hergestellt. Je 100 µl dieser Lösung wurden in ein zuvor mit Chloroform gespültes Reagenzglas gegeben und das Lösungsmittel in einem Wasserbad oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des Lipids für 30 Minuten in einem Stickstoffstrom verblasen. Das Lipid schlägt sich dabei in Form eines dünnen Films an der Glaswand des Reagenzglases nieder. Eventuelle Lösungsmittelreste wurden durch anschließendes zweistündiges Trocknen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des Lipids im Vakuum entfernt. Der so erhaltene Lipidfilm kann im Kühlschrank für mehrere Wochen gelagert werden. Der Lipidfilm wurde in 1 ml Pufferlösung aufgenommen, für 15 Minuten im Wasserbad auf eine Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des Lipids erhitzt und drei mal für je 30 Sekunden geschüttelt. Die erhaltene Suspension aus multilamellaren Vesikeln wurde anschließend in drei Schritten insgesamt 31 mal oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur des Lipids durch eine Polycarbonatmembran entsprechender Porengröße gedrückt. Die entstandenen Vesikel sind unilamellar und haben eine Größe, die mit dem Porendurchmesser der Polycarbonatmembran korreliert ist¹⁰. Während der gesamten Präparation sollte die Temperatur der Suspension nicht unter die Phasenumwandlungstemperatur des verwendeten Lipids oder der Lipidmischung fallen.

Beschallungsmethode

Zur Herstellung polyelektrolytgestützter Lipiddoppelschichten wurden die über die Extrusionsmethode hergestellten Vesikel zusätzlich für 3 Minuten mit einem *Tip-Sonifier Cell Disruptor B15* der Firma Branson beschallt. Die entstehenden Vesikel sind unilamellar und haben eine Größe von etwa 40 – 50 nm.

Präparation von Giant Vesicles

Unilamellare *Giant Vesicles* wurden aus einer Lipidmischung bestehend aus

Mischung 1: 70 w% Asolectin

25 w% 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG)

5 w% Cholesterol

¹⁰ Nach MacDonald et al. ergeben sich bei Verwendung einer Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm Vesikelgrößen von (80 ± 25) nm [23].

Mischung 2: 70 w% Asolectin
25 w% 1,2-**Dimyristoyl**-*sn*-glycero-3-**phosphoglycerol** (DMPG)
5 w% Cholesterol

Mischung 3: 70 w% Asolectin
25 w% POPG bzw. DMPG und
5 w% 1-Palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholin
(Lyso-PC)

hergestellt. Die Lipide wurden nach der oben beschriebenen Vorgehensweise im jeweiligen Mischungsverhältnis verblasen und über Nacht bei Raumtemperatur in Reinstwasser oder 200 mM Sorbitol (Konzentration 0.1 - 0.2 mg/ml) rehydratisiert. Die *Giant Vesicles* bildeten sich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ geladenen Lipiddoppelschichten selbständig aus und waren über mehrere Wochen stabil [43]. Zur Untersuchung der *Giant Vesicles* mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde 1 mol % des Fluoreszenzfarbstoffes *β -Bodipy* zur Stammlösung der Lipide gegeben.

4.4.4 Präparation von Lipidmembranen

Präparation von Lipidschichten auf Basis von negativ geladenen Oberflächen

Für die Präparation von Lipidschichten auf einer negativ geladenen Oberfläche wurde das positiv geladene Lipid N,N-**Dioctadecyl**-N,N-dimethylammoniumbromid (DODAB) verwendet. In Anlehnung an die von Michalke und Hennesthal verwendeten Präparationsparameter [50, 92] erfolgte die Funktionalisierung des mit 25 nm Gold beschichteten porösen Substrates mittels 3-Mercaptopropionsäure (MPA).

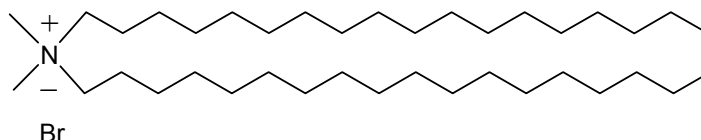


Abb. 4.6. Struktur von N,N-**Dioctadecyl**-N,N-dimethylammoniumbromid (DODAB).

Zur Präparation der Lipiddoppelschicht wurde das funktionalisierte Substrat für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer über die Extrusionsmethode hergestellten DODAB-Vesikelsuspension (1mg/ml) inkubiert. Für die Vesikelherstellung wurden Polycarbonatmembranen mit Porendurchmessern von nominell 100 nm eingesetzt. Als Puffer wurde 10 mM Tris/H₂SO₄ pH 8.6 verwendet. Nach erfolgter Inkubation wurde die Probe mehrmals mit Puffer gespült, um nicht gespreitete Vesikel von der Oberfläche zu entfernen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probe immer mit Puffer bedeckt bleibt, da das Trockenfallen der Probe eine Zerstörung der Membran zur Folge hätte.

Präparation von Lipidmembranen auf Basis von positiv geladenen Oberflächen

Das mit 11-Amino-undecanthiol (MUA) funktionalisierte Substrat wurde über Nacht bei einer Temperatur von 30 °C in einer 1,2-**Dimyristoyl**-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) -Vesikelsuspension inkubiert. DMPG-Vesikel mit einem nominellen Durchmesser von 400 nm wurden in 10 mM MES/NaOH, pH 5.0 präpariert und in einer Konzentration von 1 mg/ml auf die Oberfläche gegeben. Nach der Inkubation wurde die Probe mehrmals mit 10 mM MES/NaOH, pH 5.0 gespült.

Präparation von Lipidmembranen aus Giant Vesicles

Zur Präparation von Lipidschichten basierend auf *Giant Vesicles* wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt: Bei der ersten Methode wurde die mit MEA funktionalisierte Oberfläche für mehrere Stunden bei Raumtemperatur in der Vesikelsuspension ($c = 0.1 - 0.2$ mg/ml) inkubiert, gefolgt von gründlichem Spülen mit Reinstwasser. Bei der zweiten Methode wurde während der Inkubation mit Vesikellösung eine Spannung von +100 mV an das unbelegte Aluminatsubstrat relativ zu einem Platindraht über Nacht angelegt. Anschließend wurde die Probe mehrmals mit Reinstwasser gespült, um Vesikel aus der Lösung und von der Membran zu entfernen.

Präparation von Lipidmembranen aus thiolipidhaltigen Vesikeln

Für die Präparation von Lipidschichten aus thiolipidhaltigen Vesikeln wurde eine Lipidmischung aus 1,2-**Dioleoyl**-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und 1,2-**Dipalmitoyl**-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPE) verwendet. Hierzu wurden unilamellare Vesikel über die Extrusionsmethode mit einem nominellen Durchmesser von 400 nm und einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Als Puffer wurde 10 mM Bis-Tris/H₂SO₄ mit 10 mM Na₂SO₄ pH 5.5 verwendet. Um eine Luftblasenbildung an der Oberfläche während der Inkubation zu vermeiden, wurde der Puffer vor der Vesikelpräparation über eine Wasserstrahlpumpe entgast.

Das mit 25 nm Gold belegte poröse Substrat bzw. eine planare Goldoberfläche wurde für 5 Minuten im Argon-Plasma gereinigt und über Nacht bei einer Temperatur von 50 °C in der Vesikelsuspension inkubiert. Anschließend wurde die Probe mehrmals mit Puffer gespült.

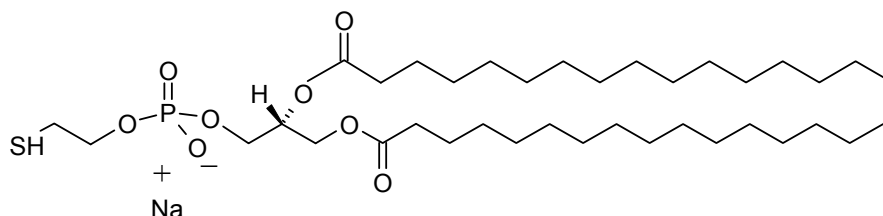


Abb. 4.7. Strukturformel von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPTE).

Präparation von Lipidmembranen auf Polyelektrolyten

Zur Präparation von polyelektrolytgestützten Lipidschichten wurden Vesikel aus zwitterionischem 1,2-**D**imyristoyl-*sn*-glycero-3-**p**hosphocholin (DMPC) und negativ geladenem 1,2-**D**imyristoyl-*sn*-glycero-3-**p**hosphoglycerol (DMPG) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen hergestellt. In Anlehnung an die Präparation von Majewski et al. [5] wurden die über die Extrusionsmethode hergestellten Vesikel für einige Minuten mit einem Tip-Sonifier beschallt, was eine Verkleinerung der Vesikel auf etwa 40 – 50 nm zur Folge hat. Die Inkubation der polyelektrolytbeschichteten Probe (s. Kap. 4.4.2) in der Vesikelsuspension erfolgte für 30 Minuten bei einer Temperatur von 30 °C. Anschließend wurde die Probe mit Reinstwasser gespült, ohne jedoch die überstehende Flüssigkeit ganz zu entfernen.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der porösen Aluminate

Im ersten Teil der Arbeit wurde das poröse Substrat – poröses Aluminat - zunächst mit verschiedenen Methoden hinsichtlich seiner Porösität, Morphologie und seiner elektrischen Eigenschaften untersucht.

5.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Ein wichtiges Charakteristikum poröser Substrate ist ihre Oberflächenporösität, die über rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bestimmt werden kann. Im Fall zylindrischer Poren entspricht die Oberflächenporösität der Porösität. Abb. 5.1 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Bruchkante eines Aluminats, das bei einer Spannung von 40 V in 0.3 M Oxalsäure anodisiert wurde. Das senkrechte Porenwachstum ist deutlich zu erkennen. Die Oberflächenporösität kann daher in erster Näherung mit der Porösität gleichgesetzt werden.

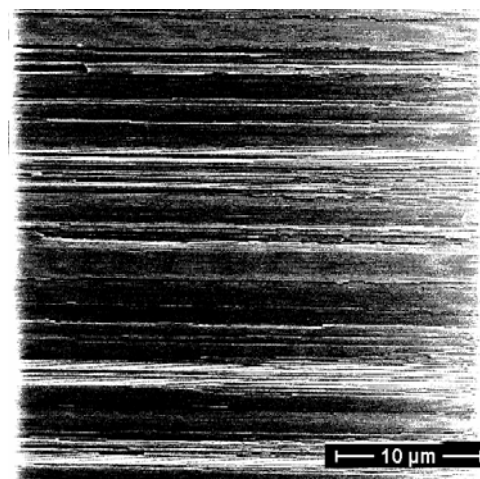


Abb. 5.1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Bruchkante porösen Aluminats, das bei 40 V in 0.3 M Oxalsäure anodisiert wurde. Das senkrechte Porenwachstum ist deutlich zu erkennen.

Zur Bestimmung der Oberflächenporosität wurden Messungen sowohl an Proben durchgeführt, die mittels eines einstufigen Anodisierungsprozesses hergestellt wurden als auch an solchen, die nach einem zweistufigen Anodisierungsprozess erhalten wurden. Abb. 5.2 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Aluminatprobe, die über einen einstufigen Anodisierungsprozess hergestellt und im Anschluss an den Anodisierungsprozess ausgedünnt (s. Kap. 4.2.2). sowie mit 25 nm Gold belegt wurde. Es zeigt sich, dass eine ungeordnete Porenstruktur erhalten wurde. Die Poren weisen einen mittleren Durchmesser von (22 ± 6) nm auf. Die Oberflächenporosität wurde mittels der in Abb. 5.2 B dargestellten Bearbeitung der Aufnahme mit dem Programm *SPIP* durchgeführt. Die Oberflächenporosität liegt bei (17 ± 3) %. Abb. 5.3 A zeigt eine Aufnahme eines Aluminats, das über einen zweistufigen Anodisierungsprozess hergestellt und im Anschluss an den Anodisierungsprozess ausgedünnt und mit 25 nm Gold belegt wurde. In diesem Fall ist deutlich die geordnete Porenstruktur zu erkennen. Der Porenabstand beträgt (110 ± 15) nm, der mittlere Durchmesser der Poren (31 ± 9) nm. Die über die in Abb. 5.3 B dargestellte Maske ermittelte Oberflächenporosität beträgt (36 ± 7) %. Sowohl der Porendurchmesser als auch die Porosität sind größer als die der ungeordneten Poren, die Stege sind demnach schmaler als im Fall ungeordneter Proben.

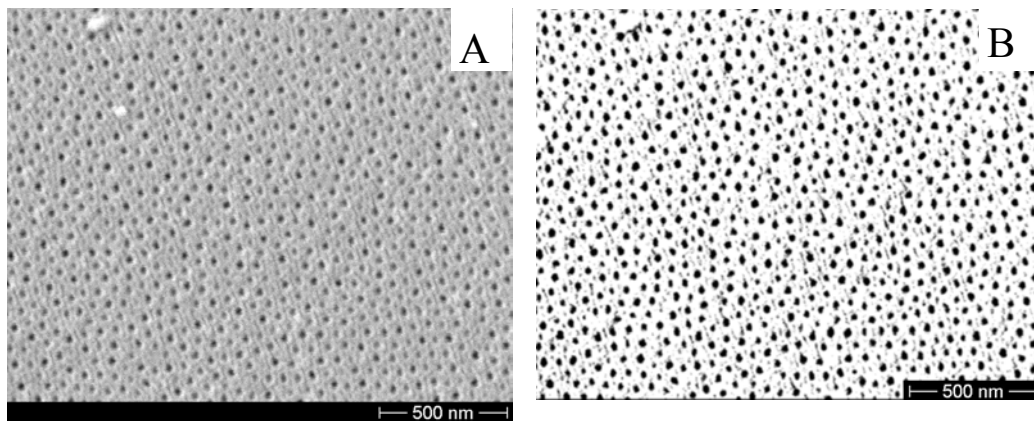


Abb. 5.2. A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines ausgedünnten Aluminats, das nach einem einstufigen Anodisierungsprozess erhalten und mit 25 nm Gold belegt wurde. Es wurden ungeordnete Porenstrukturen erhalten. B) Bearbeitung von Bild A, die zur Bestimmung der Porosität mit dem Programm *SPIP* verwendet wurde. Die ermittelte Oberflächenporosität beträgt (17 ± 3) %.

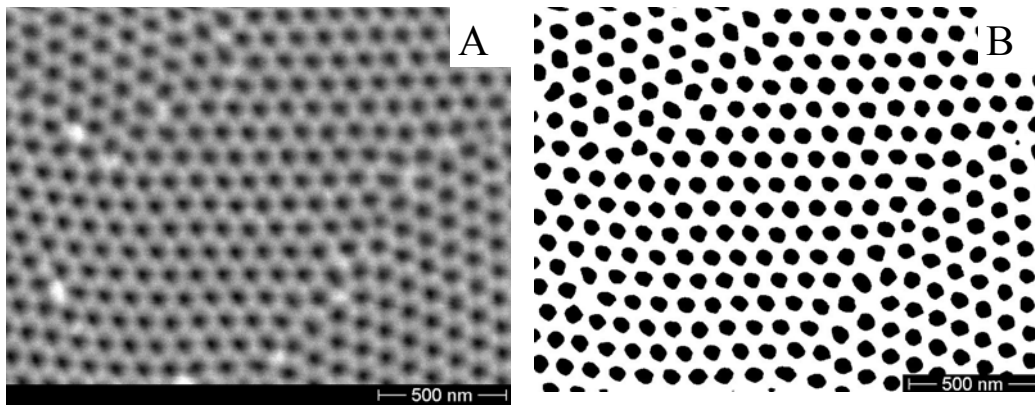


Abb. 5.3. A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines ausgedünnten Aluminats, das nach einem zweistufigen Anodisierungsprozess erhalten und mit 25 nm Gold belegt wurde. Die geordnete Porenstruktur ist deutlich zu erkennen. B) Bearbeitung von Bild A, die zur Bestimmung der Porosität mit dem Programm *SPIP* verwendet wurde. Die ermittelte Porosität beträgt $(36 \pm 7) \%$.

5.1.2 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Die Rasterkraftmikroskopie ist aufgrund des hohen Auflösungsvermögens auch in wässriger Lösung eine geeignete Methode zur Abbildung nanoporöser Substrate. Sie erlaubt eine klare Abbildung von Poren mit einem Durchmesser von 40 – 50 nm.

Gegenstand der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung waren sowohl ungeordnete als auch geordnete Proben, die nach dem Anodisierungsprozess jeweils für 3 Stunden chemisch aufgeweitet wurden (siehe Kap. 4.2.2).

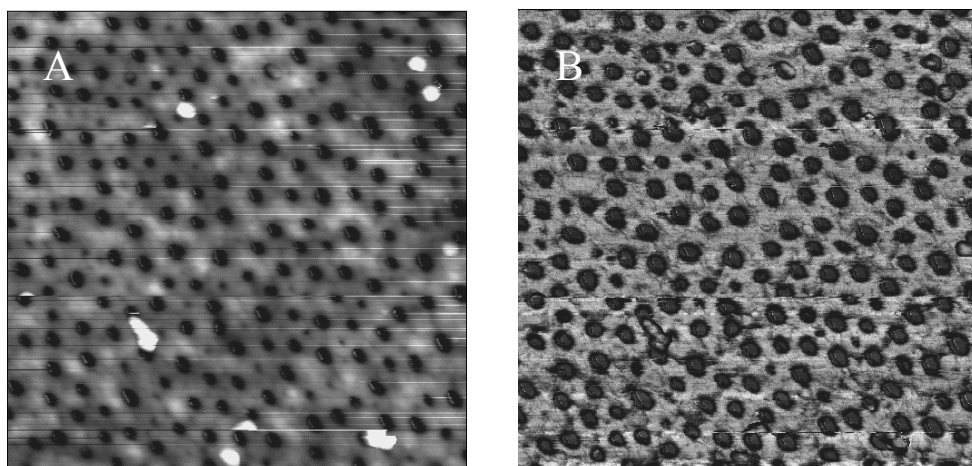


Abb. 5.4. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Intermittent-Contact-Mode*, $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) eines ungeordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminats. Die dunkel dargestellten Poren sind deutlich zu erkennen und weisen einen Durchmesser von $(20 \pm 6) \text{ nm}$ auf. A) Topographie mit einer Höhenskala von 30 nm. B) Phasenbild mit einer Skala von 20° .

Abb. 5.4 zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) eines porösen Aluminatsubstrats. Der Träger wurde über einen einfachen Ätzprozess hergestellt wurde und weist somit eine ungeordnete Porenstruktur auf. Abb. 5.4 A gibt die Höheninformation der untersuchten Probenstelle mit einer Höhenskala von 30 nm wieder, Abb. 5.4 B die Phaseninformation mit einer Skala von 20° . Die dunkel dargestellten Poren sind deutlich zu erkennen und weisen einen mittleren Durchmesser von $(20 \pm 6) \text{ nm}$ auf.

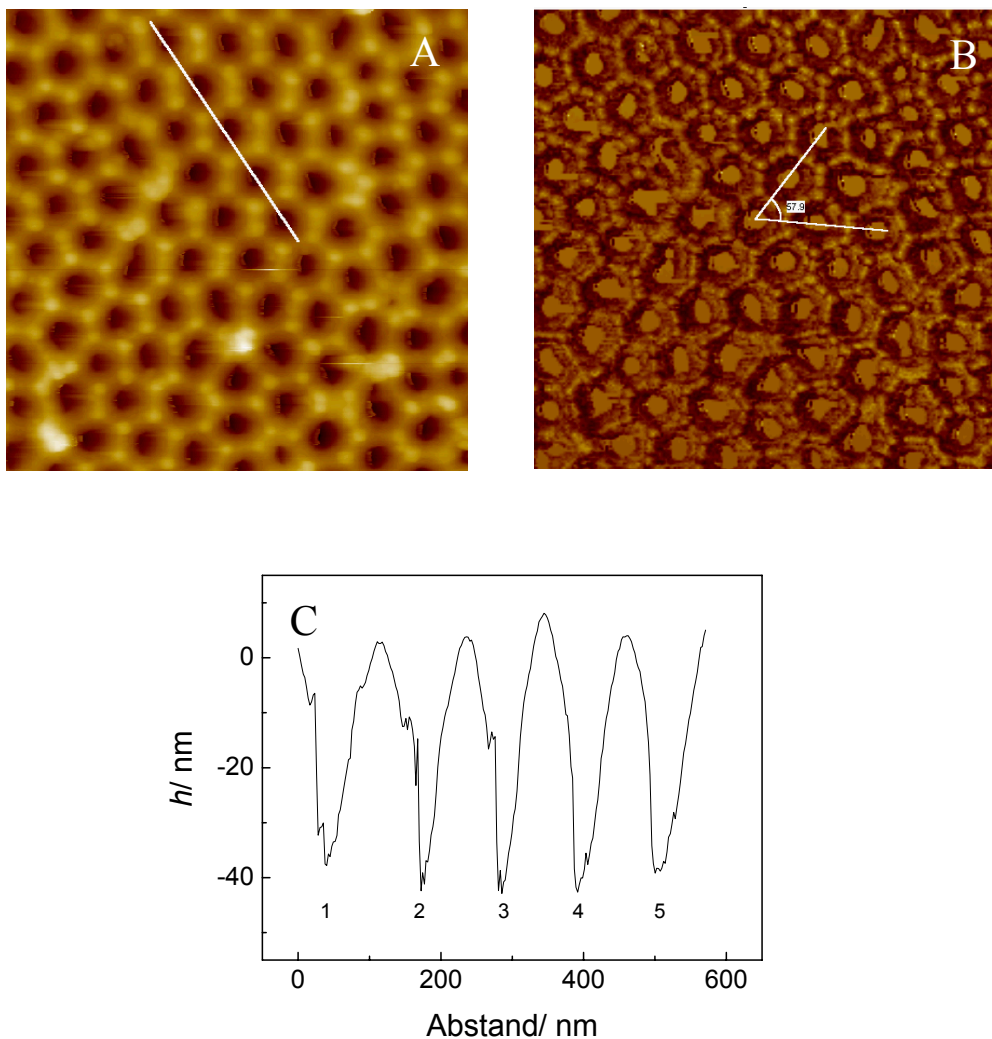


Abb. 5.5. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Intermittent-Contact-Mode*) eines geordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminats ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$). Die hexagonale Anordnung der Poren, die einen Durchmesser von $(35 \pm 8) \text{ nm}$ aufweisen, ist deutlich zu erkennen. A) Topographie mit einer Höhenskala von 110 nm. B) Phasenbild mit einer Skala von 51° . C) Höhenanalyse entlang der in A) gezeigten Linie.

Abb. 5.5 zeigt die rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines geordneten, chemisch aufgeweiteten, porösen Aluminats ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$). Abb. A gibt die Höheninformation mit einer Höenskala von 110 nm wieder, Abbildung B die Phaseninformation mit einer Skala von 51° . Die Poren weisen einen Durchmesser von (35 ± 8) nm auf und sind damit geringfügig größer als die ausgedünnten, ungeordneten Poren. Die hexagonale Anordnung der Poren ist deutlich zu erkennen. Eine Höhenanalyse entlang der in A gezeigten Linie verdeutlicht die Regelmässigkeit der Porenanordnung (Abb. 5.5 C). Die Rasterkraftspitze tritt etwa 40 nm tief in die fünf dargestellten Poren ein.¹¹ Der Winkel zwischen zwei benachbarten Poren beträgt $(59 \pm 5)^\circ$ und ist charakteristisch für eine hexagonale Anordnung der Poren. Beispielfhaft ist in Abb. 5.5 B ein solcher Winkel angegeben. Die Fouriertransformation einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme eines geordneten, porösen Aluminats ist in Abb. 5.6 dargestellt und lässt deutlich die hexagonale Anordnung der Poren erkennen.

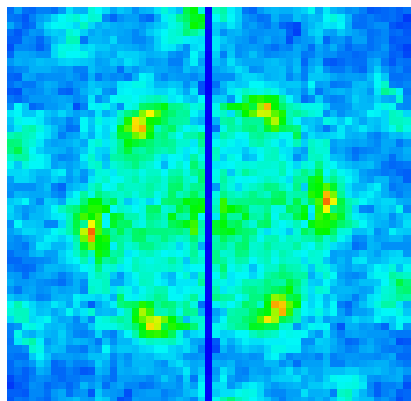


Abb. 5.6. Fouriertransformation einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme eines geordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminats.

Wie die in Abb. 5.7 dargestellte Messung zeigt ($9 \times 10 \mu\text{m}^2$), sind die geordneten Bereiche nicht auf kleine Ausschnitte begrenzt, sondern erreichen Größen von bis zu $(1.5 \times 1.5) \mu\text{m}^2$. Die Ordnung wird jeweils durch auftretende Korngrenzen unterbrochen.

¹¹ Die Eindringtiefe der Rasterkraftspitze wird von der Spitzengeometrie bestimmt.

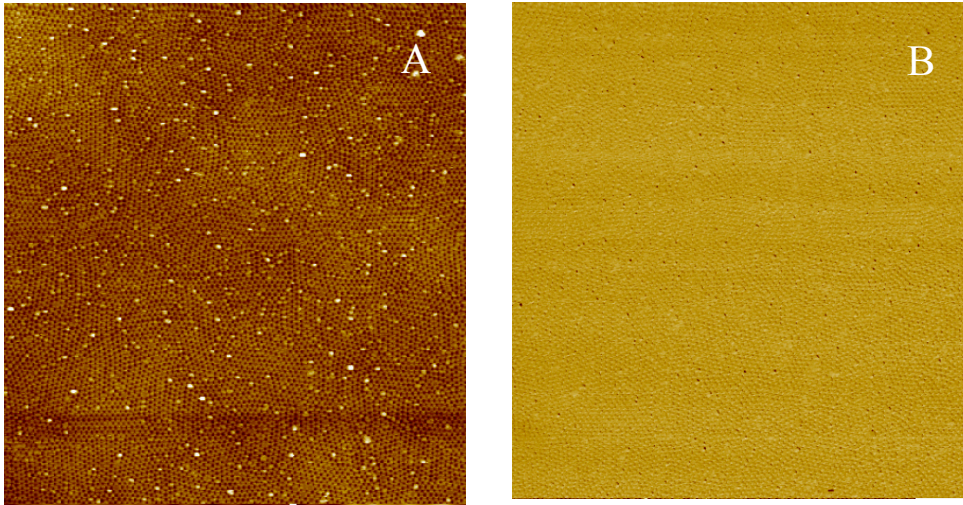


Abb. 5.7. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Contact-Mode*, $9 \times 10 \mu\text{m}^2$) eines geordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminats. Die hexagonale Anordnung der Poren über den gesamten Bildausschnitt ist deutlich zu erkennen. A) Topographie mit einer Höhenskala von 100 nm. B) Fehlersignal mit einer Höhenskala von 20 nm.

5.1.3 Interferometrische Untersuchungen

Wird ein poröser Aluminatträger mit weißem Licht bestrahlt, entsteht ein Fabry-Perot-Muster. Abb. 5.8 A zeigt beispielhaft das Spektrum eines porösen, ungeordneten Aluminats, das in 0.3 M Oxalsäure bei $T = 2^\circ\text{C}$ und $U = 40 \text{ V}$ für 3 Stunden anodisiert wurde. Das entstehende Spektrum lässt sich auf multiple Reflektionen des eingestrahlteten weißen Lichts an der Luft-Oxid- sowie der Oxid-Aluminium-Grenzfläche zurückführen. Über nicht-lineare Kurvenanpassung und Fourier-Analyse lässt sich die effektive optische Dicke $2n_{\text{eff}}d$ aus dem Interferenzspektrum ermitteln. Der effektive Brechungsindex kann mittels der effektiven Mediumstheorie von Bruggeman, die für zylindrische Poren entwickelt wurde [93], abgeschätzt werden:

$$\frac{n_{\text{Füllung}}^2 - n_{\text{eff}}^2}{n_{\text{Füllung}}^2 + n_{\text{eff}}^2} \cdot p + \frac{n_{\text{Allox}}^2 - n_{\text{eff}}^2}{n_{\text{Allox}}^2 + n_{\text{eff}}^2} \cdot (1 - p) = 0 \quad (5.1)$$

Mit dem Brechungsindex für Luft $n_{\text{Luft}} = 1.003$, Aluminumoxid $n_{\text{Allox}} = 1.63$ und der Porosität $p = 0.17$ für ungeordnete Poren kann so ein effektiver Brechungsindex des porösen Aluminats von $n_{\text{eff}} = 1.51$ berechnet werden. Die verwendete Gleichung ist im Anhang A1 gegeben.

Durch Variation des Brechungsindex der Füllung $n_{\text{Füllung}}$ kann mittels Gleichung 0 die Porosität des porösen Materials abgeschätzt werden. Zur Überprüfung der

Porosität einer ungeordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminatprobe, die in 0.3 M Oxalsäure bei $T = 2\text{ °C}$ bei $U = 40\text{ V}$ für 3 h anodisiert wurde, wurde diese mit mehreren Lösungsmitteln verschiedener Brechungsindizes $n_{\text{Füllung}}$ überschichtet. Das Lösungsmittel füllt die Poren, was eine Änderung des effektiven Brechungsindex n_{eff} hervorruft. Bei konstanter Dicke d der Probe hat dies eine Veränderung der effektiven optischen Dicke $2n_{\text{eff}}d$ in Abhängigkeit vom jeweiligen Brechungsindex $n_{\text{Füllung}}$ des eingesetzten Lösungsmittels zur Folge. In Abb. 5.8 B ist die effektive optische Dicke $2n_{\text{eff}}d$, die über nicht-lineare Kurvenanpassung und Fourier-Analyse aus dem Interferenzspektrum ermittelt wurde, gegen den Brechungsindex $n_{\text{Füllung}}$ des eingesetzten Lösungsmittels aufgetragen. Unter der Annahme einer zylindrischen Porenform lässt sich mittels Gleichung 0 die effektive optische Dicke $2n_{\text{eff}}d$ als Funktion des Brechungsindex $n_{\text{Füllung}}$ angeben. Die erhaltene Gleichung ist im Anhang A1 gegeben. Eine Anpassung an die Daten ergibt eine Porosität von $(29 \pm 2)\%$ und eine Schichtdicke von $(6.2 \pm 0.03)\text{ }\mu\text{m}$. Die erhaltene Porosität ist größer als die durch eine Abschätzung anhand der Oberflächenporosität erhaltene von $(17 \pm 3)\%$ (s. Kap. 5.1.1). Die erhaltene Schichtdicke stimmt mit den Literaturdaten überein, da die Probe für 3 Stunden anodisiert wurde und die Porenwachsrates etwa $2\text{ }\mu\text{m/h}$ beträgt [82-85].

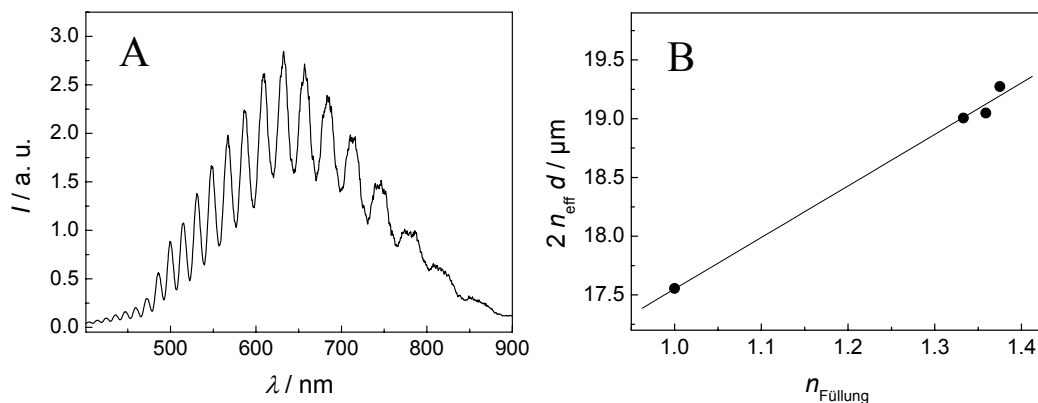


Abb. 5.8. A) Bei der Bestrahlung eines porösen Aluminatsubstrats mit weißem Licht entsteht ein Fabry-Perot-Muster. Gezeigt ist ein Interferenzspektrum, erhalten von ungeordnetem, porösem Aluminat, das in 0.3 M Oxalsäure bei $T = 2\text{ °C}$ und $U = 40\text{ V}$ für 3 Stunden anodisiert wurde. B) Effektive optische Dicke eines ungeordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminatsubstrats, das für 3 Stunden anodisiert wurde, bei Bedeckung mit verschiedenen Lösungsmitteln. Aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes $n_{\text{Füllung}}$ der Lösungsmittel ändert sich bei porösen Materialien der effektive Brechungsindex n_{eff} bei konstanter Dicke d der Probe und damit die effektive optische Dicke $2n_{\text{eff}}d$. Die durchgezogene Linie resultiert aus einer Anpassung der im Anhang A1 gegebenen Gleichung.

Zur Überprüfung der Homogenität der hergestellten Proben wurden mehrere Spektren einer ungeordneten, porösen Aluminatprobe in Abständen von jeweils 1 mm aufgenommen. Der resultierende prozentuale Fehler der effektiven optischen Dicke $2n_{\text{eff}}d$ beträgt 0.6 % und ist damit vernachlässigbar klein. Wiederholtes Spülen der Probe mit Reinstwasser und Trocknen im Stickstoffstrom vergrößert den prozentualen Fehler auf 1.5 %. Der größere Fehler ist wahrscheinlich auf Wasserreste in den Poren zurückzuführen.

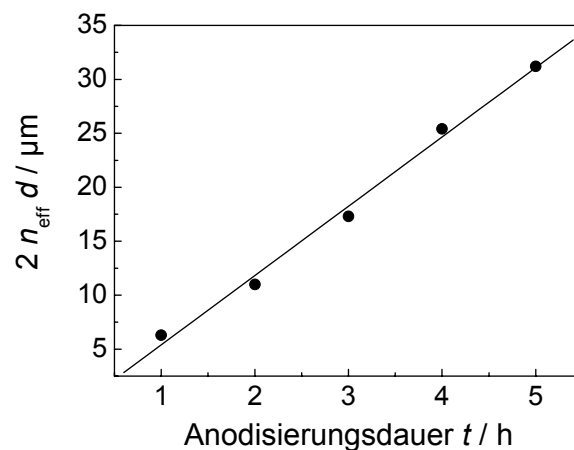


Abb. 5.9. Abhängigkeit der effektiven optischen Dicke $2n_{\text{eff}}d$ der porösen Schicht von der Anodisierungsdauer t . Es wurden ungeordnete, poröse Aluminate, die nach unterschiedlich langen Anodisierungszeiten erhalten wurden, an Luft vermessen. Die durchgezogene Linie resultiert aus einer linearen Anpassung mit einer Steigung von $6.4 \mu\text{m/h}$.

Zwischen der Dicke der porösen Schicht und der Dauer des Anodisierungsprozesses besteht nach Literaturangaben ein linearer Zusammenhang [85]. Zur Überprüfung der Linearität der Schichtdicken in Abhängigkeit von der Anodisierungsdauer wurde die effektive optische Dicke von ungeordneten, porösen Aluminaten bestimmt, die nach unterschiedlich langen Anodisierungszeiten erhalten wurden. Die Schichtdickenbestimmung wurde mit Hilfe der Interferometrie vorgenommen. Für poröses Silizium wurden bereits entsprechende Untersuchungen durchgeführt [94], auch an planarem Aluminiumoxid fand diese Technik für Schichten größer 10 nm Anwendung [87]. In Abb. 5.9 ist die effektive optische Dicke $2n_{\text{eff}}d$ gegen die Anodisierungsdauer t aufgetragen. Die Messungen der porösen Aluminate wurden an Luft durchgeführt. Die durchgezogene Linie zeigt eine lineare Anpassung an die Daten mit der Steigung $6.4 \mu\text{m/h}$. Es wird angenommen, dass der effektive Brechungsindex während des Anodisierungsprozesses konstant bleibt, während die Dicke d der porösen Schicht kontinuierlich zunimmt. Unter Berücksichtigung von dem nach Gleichung 0 berechneten n_{eff} an Luft kann aus der erhaltenen Steigung von

6.4 $\mu\text{m/h}$ eine lineare Porenwachstumsrate von 2.1 $\mu\text{m/h}$ berechnet werden. Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem von anderen Gruppen berechneten Wert überein [82-85].

5.1.4 Impedanzspektroskopische Untersuchungen

Eine Voraussetzung für eine elektrische Charakterisierung der porenüberspannenden Lipidmembranen besteht in einem umfassenden Verständnis der elektrischen Eigenschaften des porösen Substrats. Aus diesem Grund wurde das Substrat zunächst impedanzspektroskopisch gemessen und die Untersuchungsparameter wie z.B. die Art des eingesetzten Elektrolyten optimiert. In einem weiteren Schritt folgte das Erstellen eines Modells zur adäquaten Beschreibung der elektrischen Eigenschaften des porösen Aluminats.

Einfluss des Elektrolyten

Die ersten Impedanzmessungen an elektropoliertem Aluminium und porösem Aluminat wurden in 100 mM Natriumchlorid durchgeführt.

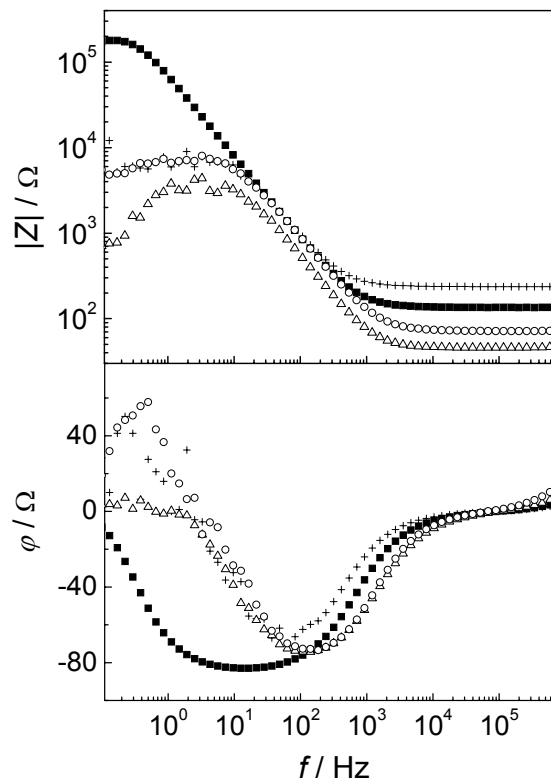


Abb. 5.10. Impedanzspektren von elektropoliertem Aluminium in verschiedenen Elektrolyten (Fläche 0.8 cm²). (■) 100 mM Na₂SO₄; (○) 100 mM NaCl; (Δ) 100 mM KBr; (+) 100 mM NaI.

Abb. 5.10 zeigt ein Spektrum eines elektropolierten Aluminiumträgers in 100 mM NaCl (○). Die Impedanz zeigt kein über herkömmliche Bauelemente erklärbares Verhalten. Im Bereich niedriger Frequenzen f sinkt der Betrag der Impedanz $|Z|$ mit abnehmender Frequenz, die Phasenverschiebung φ steigt. Zudem wurden keine konstanten Impedanzspektren erhalten, die Spektren wiesen keine Reproduzierbarkeit auf. Aus diesem Grund wurden Messungen von elektropoliertem Aluminium in weiteren Elektrolyten durchgeführt. Abb. 5.10 zeigt zudem Impedanzspektren einer elektropolierten Probe, die in 100 mM Natriumsulfat (■), 100 mM Kaliumbromid (Δ) und 100 mM Natriumiodid (+) aufgenommen wurden. Die in Kaliumbromid und Natriumiodid durchgeführten Messungen weisen die gleichen Charakteristika auf wie die in Natriumchlorid angefertigten¹². Dies trifft auch für – in der Abbildung nicht dargestellte – Spektren zu, die in mit Salzsäure titrierten Puffern aufgenommen wurden.

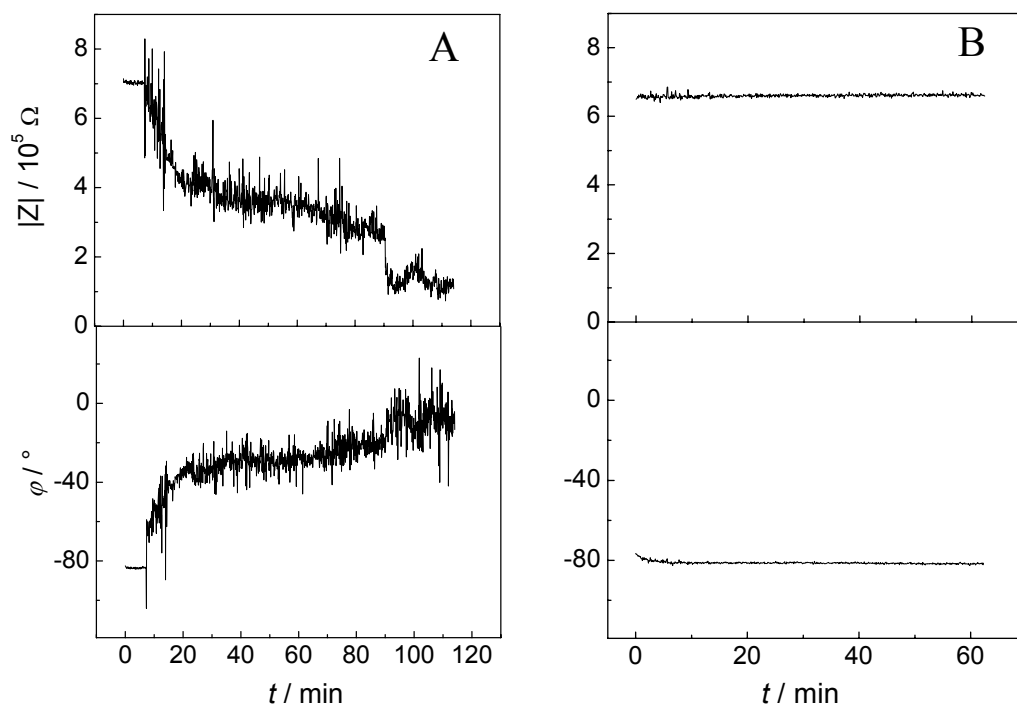


Abb. 5.11. A) Impedanzspektroskopische Messung an porösem, ungeordnetem Aluminat in 100 mM NaCl bei einer Frequenz f von 1 Hz (Fläche 0.8 cm²). Die erhaltene Impedanz sollte im Fall einer sich nicht verändernden Probe zeitlich konstant bleiben. Im Fall von NaCl als Elektrolyt ist ein sprunghaftes Abfallen von $|Z|$ sowie ein Ansteigen von φ zu erkennen. B) Impedanzspektroskopische Messung an porösem, ungeordnetem Aluminat in 100 mM Na₂SO₄ bei einer Frequenz f von 1 Hz (Fläche 0.8 cm²). Der erhaltene Betrag der Impedanz $|Z|$ und die Phasenverschiebung φ bleiben bis auf statistische Schwankungen zeitlich konstant.

¹² Für poröse Aluminate wurden Impedanzspektren mit prinzipiell gleichen Charakteristika erhalten, jedoch weniger stark ausgeprägt.

Das Spektrum eines elektropolierten Aluminiumträgers, das in 0.1 M Natriumsulfat erhalten wurde, ist hingegen reproduzierbar und prinzipiell mit einfachen passiven Bauelementen beschreibbar. Das in den zunächst verwendeten Elektrolyten auftretende unreproduzierbare Impedanzverhalten scheint auf Korrosionseffekte zurückzuführen zu sein und wird von Halogeniden induziert.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden Messungen bei einer konstanten Frequenz f der angelegten Wechselspannung U durchgeführt, bei der die erhaltene Impedanz im Fall einer sich nicht verändernden Probe zeitlich konstant bleiben sollte. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden die Messungen im Faradaykäfig durchgeführt. Eine Messung, die bei einer Frequenz f von 1 Hz an ungeordnetem, porösem Aluminat in 100 mM Natriumchlorid durchgeführt wurde, ist in Abb. 5.11 A dargestellt. Die Messung weist ein mehrfaches sprunghaftes Abfallen des Betrages der Impedanz $|Z|$ sowie ein Ansteigen der Phasenverschiebung φ auf, was auf eine Veränderung der untersuchten Probe durch den Elektrolyten zurückzuführen sein kann. Abb. 5.11 B zeigt im Vergleich eine Impedanzmessung eines ungeordneten, porösen Aluminats, die bei einer konstanten Frequenz f von 1 Hz in 100 mM Natriumsulfat durchgeführt wurde. Abgesehen von statistischen Schwankungen ist keine Zeitabhängigkeit zu erkennen. Dieses Ergebnis verifiziert die Reproduzierbarkeit der in Natriumsulfat aufgenommenen Spektren. Alle nachfolgenden Messungen an Aluminaten wurden ohne Verwendung von Halogeniden durchgeführt.

Modelle zur Beschreibung des porösen Aluminats in der Literatur

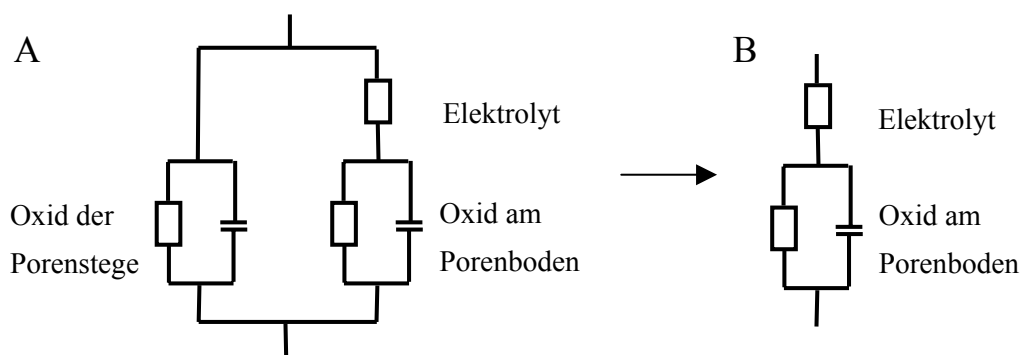


Abb. 5.12. A) Ersatzschaltbild für die porösen Aluminate nach Hoar and Wood. Der Parallelkreis aus einem Kondensator und einem ohmschen Widerstand repräsentiert die Porenstege, während die Parallelschaltung aus einem Kondensator und einem ohmschen Widerstand in Serie zu einem ohmschen Widerstand die elektrolyt-gefüllten Poren sowie die Porenböden beschreibt. B) Aufgrund des hohen ohmschen Widerstandes und der kleinen Kapazität der Porenstege können die elektrischen Eigenschaften der Porenstege im beobachteten Frequenzfenster vernachlässigt werden. Gezeigt ist das resultierende Schaltbild.

Zur Beschreibung des elektrischen Impedanzverhaltens von porösen Aluminaten wurden verschiedene Modelle entwickelt. Frühe Untersuchungen von Hoar und Wood [95] resultierten in dem in Abb. 5.12 dargestellten Ersatzschaltkreis. Die Parallelschaltung eines Kondensators und eines ohmschen Widerstandes repräsentieren die elektrischen Eigenschaften der Porenstege, während eine parallel dazu geschaltete Parallelschaltung aus Kapazität und Widerstand in Serie zu einem ohmschen Widerstand die elektrolyt-gefüllten Poren und die Porenböden beschreibt. Hoar und Wood argumentierten, dass die Porenstege einen zu großen ohmschen Widerstand und eine zu kleine Kapazität besitzen, um im untersuchten Frequenzfenster detektierbar zu sein, so dass der Ersatzschaltkreis um diese beiden Elemente reduziert werden kann. Zur Berechnung flächenbezogener spezifischer Parameter berücksichtigten sie die geometrische Fläche des porösen Aluminats, die sowohl Poren als auch Porenstege beinhaltet.

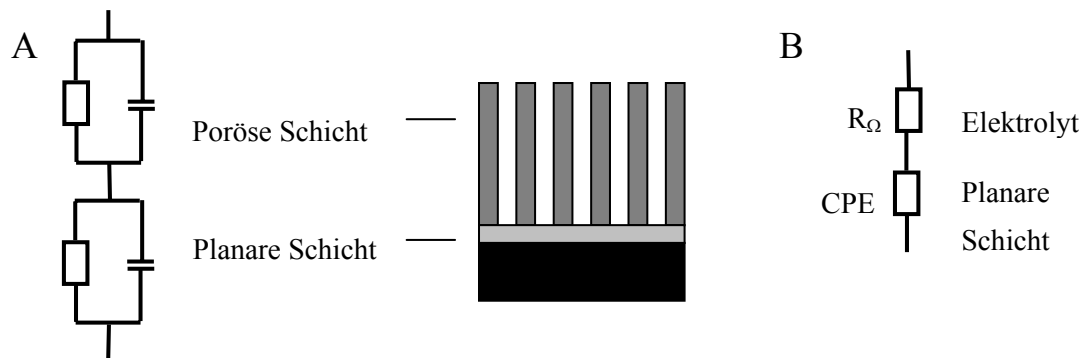


Abb. 5.13. A) Ersatzschaltbild für poröse Aluminate nach Hitzig et al. Das planare Barriereoxid und die poröse Schicht werden als zwei separate quasi-homogene Oxidphasen betrachtet, die jeweils durch eine parallele Anordnung einer Kapazität und eines ohmschen Widerstandes charakterisiert sind. B) Das Ersatzschaltbild nach Vereecken und Mitarbeitern setzt sich aus einer Serienschaltung eines *Constant Phase Elements* (CPE) anstelle einer Kapazität und einem ohmschen Widerstand zusammen.

Das Modell von Hoar und Wood wurde von Mansfeld und Kendig übernommen [96]. Hitzig et al. schlugen ein Modell vor, in dem das planare Barriereoxid und die poröse Schicht als zwei separate quasi-homogene Oxidphasen betrachtet wurde [97], die jeweils durch eine parallele Anordnung einer Kapazität und eines ohmschen Widerstandes charakterisiert wurden (Abb. 5.13 A). Sie erwarteten, dass eine Unterscheidung zwischen den Eigenschaften beider Schichten möglich ist. Vereecken und Mitarbeiter [66, 98] erstellten ein Ersatzschaltbild, das sich aus einer Serienschaltung eines *Constant Phase Elements* (CPE) anstelle der Kapazität und

einem ohmschen Widerstand zusammensetzte (Abb. 5.13 B). Das Vorkommen eines CPE lässt sich unter anderem mit Fraktalität und Oberflächenrauigkeit in Beziehung setzen [55, 57]. Der genaue Ursprung ist jedoch bislang noch ungeklärt und Gegenstand vieler Diskussionen (Kap. 3.1.3). De Levie [65] und Scheider [56] beschrieben dieses Dispersionsphänomen als endlos lange, verzweigte Netzwerke von Kapazitäten und Widerständen. Unterschiedliche Grade der Verzweigung führen zu verschiedenen Werten für den Index α [66]. Vereecken und Mitarbeiter folgerten, dass Informationen über die Porengröße, das Zellvolumen und die Zelldicke nicht direkt aus der elektrischen Impedanzspektroskopie erhalten werden können, sondern nur die Barrierschicht am Porenboden gemessen wird. Die Fläche des porösen Aluminats, die zur Berechnung flächenbezogener spezifischer Parameter verwendet wurde, wurde nicht explizit angegeben.

Entwicklung eines Modells zur Beschreibung des porösen Aluminats

Das Hauptproblem der bestehenden Modelle zur Beschreibung des porösen Aluminats besteht darin, dass die Fläche, die zur Berechnung flächenbezogener spezifischer Parameter verwendet wurde, nicht explizit angegeben ist. Um spezifische elektrische Parameter der porösen Aluminate sowie der porenüberspannenden Lipidmembranen zu erhalten, die mit Literaturdaten verglichen werden können, ist die gemessene Fläche jedoch absolut erforderlich. Abb. 5.14 zeigt eine schematische Darstellung des porösen Aluminats, bestehend aus der porösen Schicht, die sich aus dem Kanalfeld und der Barrierschicht an den Porenböden zusammensetzt, und dem Aluminium.

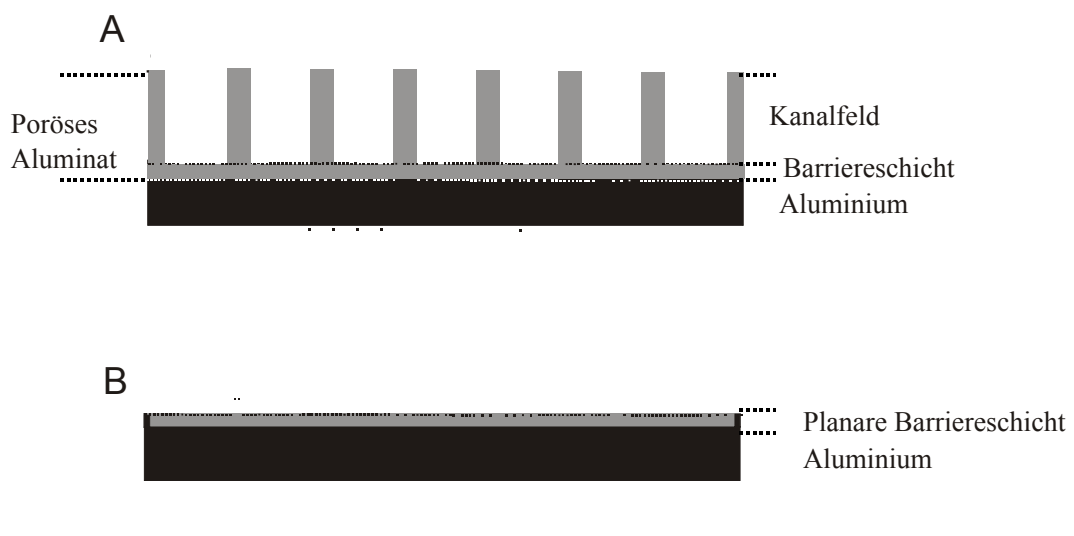


Abb. 5.14. Schematische Darstellung von porösem (A) und planarem Aluminat (B).

Um zu klären, ob das Kanalfeld des porösen Aluminats zur Gesamtimpedanz beiträgt, wurden zunächst ungeordnete Aluminatsubstrate mit unterschiedlich dicker poröser Schicht impedanzspektroskopisch untersucht. Unabhängig von der Anodisierungszeit, die einen linearen Zusammenhang zur Dicke des Kanalfelds aufweist (s. Abb. 5.9), wurden die gleichen Impedanzspektren erhalten (Abb. 5.16). Dies zeigt deutlich, dass die Dicke des Kanalfelds keinen Einfluss auf die Gesamtimpedanz des porösen Aluminats - besonders auf den frequenzabhängigen Teil, der durch die Kapazität repräsentiert wird - hat.

Zur theoretischen Beschreibung dieser Impedanzmessungen der porösen Aluminate über einen Ersatzschaltkreis werden die zwei Schichten, das Kanalfeld bestehend aus Aluminat und Elektrolytlösung und die Barrierschicht an den Porenböden, zunächst getrennt betrachtet. Das Kanalfeld lässt sich über das *parallel layer* Modell beschreiben [99]. Aluminat und Elektrolyt sind dabei über die Elektrode verteilt, die sich aus Aluminium und der Barrierschicht zusammensetzt. Die komplexe Leitfähigkeit ψ_j einer Phase ist definiert als:

$$\psi_j = \sigma_j + i\omega\varepsilon_j \quad (5.2)$$

mit der Leitfähigkeit σ_j und der Dielektrizitätskonstante ε_j der Phase j . Für das *parallel layer* Modell folgt eine lineare Durchmischung der beiden Schichten:

$$\psi_{\text{eff}} = \chi_{\text{Alox}}\psi_{\text{Alox}} + \chi_{\Omega}\psi_{\Omega} \quad (5.3)$$

χ_{Alox} und χ_{Ω} sind die Volumenanteile des Aluminats und des Elektrolyten. Der resultierende Ersatzschaltkreis besteht demnach aus zwei parallelen RC-Elementen, der sich in ein einzelnes RC-Element umgestaltet mit einer Leitfähigkeit G_{eff} von

$$G_{\text{eff}} = \chi_{\text{Alox}}\sigma_{\text{Alox}} + \chi_{\Omega}\sigma_{\Omega} \quad (5.4)$$

und einer Kapazität C_{eff} von

$$C_{\text{eff}} = \chi_{\text{Alox}}\varepsilon_{\text{Alox}} + \chi_{\Omega}\varepsilon_{\Omega} \quad (5.5)$$

Da $\sigma_{\text{el}} \gg \sigma_{\text{Alox}}$, werden G_{eff} und C_{eff} ausschließlich durch die Eigenschaften des Elektrolyten bestimmt. Im untersuchten Frequenzrahmen führt dies zu einer Vereinfachung des Ersatzschaltkreises auf einen ohmschen Widerstand R_{Ω} , der vom Elektrolytwiderstand nicht unterschieden werden kann, so dass das Kanalfeld nicht vom Elektrolytwiderstand unterscheidbar ist. Dieses stimmt mit dem Ergebnis

überein, dass unabhängig von der Dicke des Kanalfelds das gleiche Impedanzspektrum erhalten wurde. Die Barrierschicht kann durch eine Kapazität C_b repräsentiert werden, die das dielektrische Verhalten des Oxids widerspiegelt und parallel zu einem ohmschen Widerstand R_b geschaltet ist, der die Ionenleitfähigkeit des Barriereoxids charakterisiert. Setzt man die elektrischen Elemente des Kanalfelds, des Barriereoxids und des Elektrolyten zusammen, erhält man den in Abb. 5.15 gezeigten Ersatzschaltkreis (1).

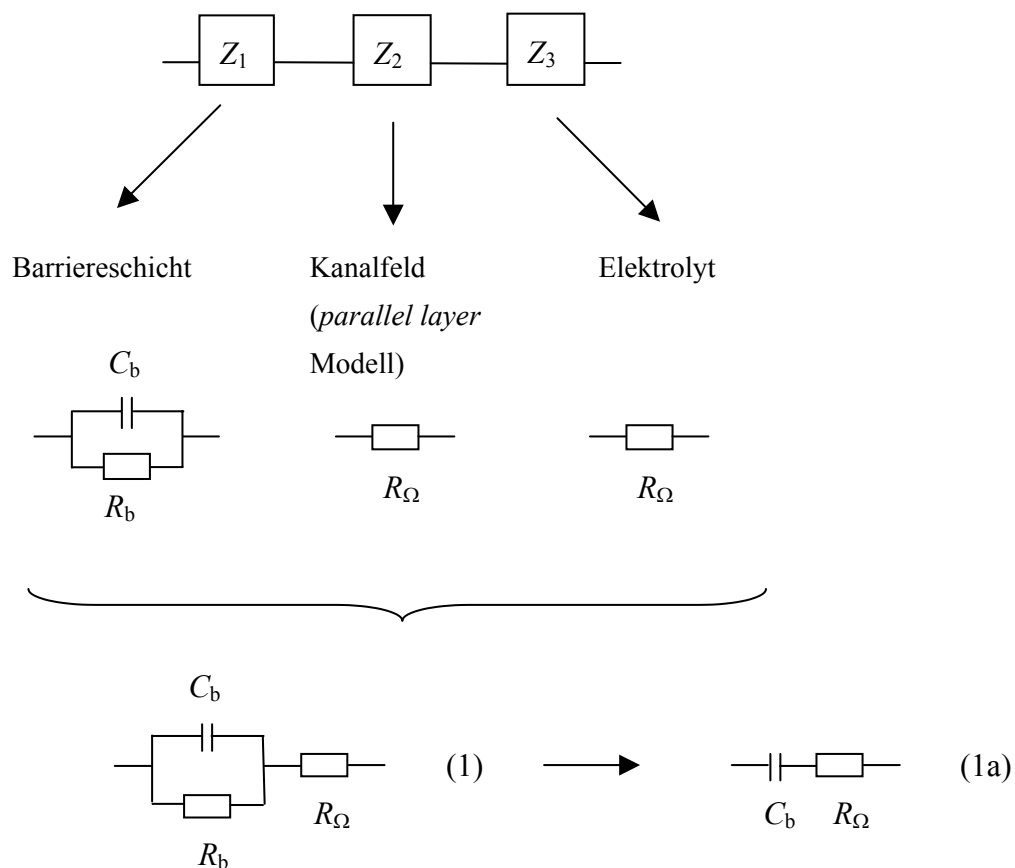


Abb. 5.15. Ersatzschaltkreis (1) für die impedanzspektroskopische Beschreibung von porösem Aluminat. Ist der Widerstand R_b zu groß, um im untersuchten Frequenzfenster detektierbar zu sein, vereinfacht sich Ersatzschaltkreis (1) zu Schaltkreis (1a).

Verifizierung des entwickelten Modells

Abb. 5.16 A zeigt das Spektrum eines ungeordneten, porösen Aluminats, das durch einen 3-stündigen Anodisierungsprozess erhalten wurde. Das Ergebnis der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (1) an die Daten ist als

durchgezogene Linie dargestellt und zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten. Da die elektrischen Eigenschaften der porösen Aluminate während des Anodisierungsprozesses unverändert bleiben und sie nur durch die Barrierschicht bestimmt werden, kann geschlossen werden, dass die Dicke des Barriereoxids konstant und somit unabhängig von der Anodisierungszeit ist. Noch wichtiger ist das Ergebnis, dass die gemessene aktive Fläche des porösen Aluminats ausschließlich durch die geometrische Fläche der Barrierschicht gegeben ist.

Unter Berücksichtigung dieser Fläche, die durch die von dem Dichtring umgebene Fläche bestimmt ist, ergeben sich spezifische Kapazitäten C_b von $(0.20 \pm 0.03) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und Widerstände größer $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ (Abb. 5.16 A). In Abb. 5.16 B ist die resultierende Kapazität C_b der Aluminate, die nach verschiedenen Anodisierungszeiten erhalten wurden, gegen die Anodisierungsdauer t aufgetragen.

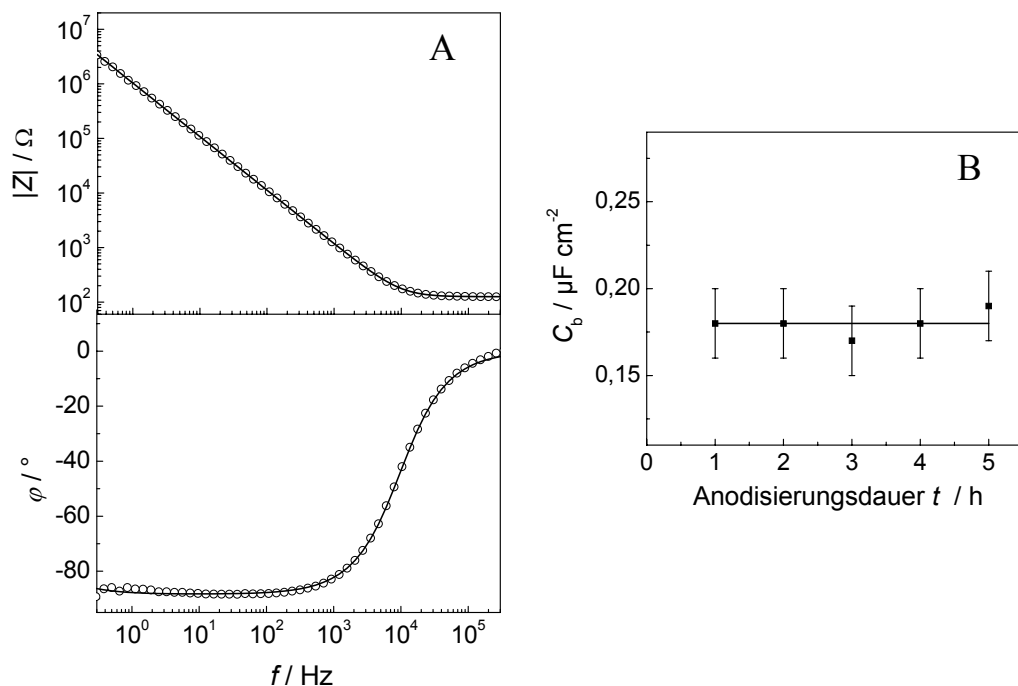


Abb. 5.16. A) Impedanzspektrum von ungeordnetem, porösem Aluminat in 100 mM Na_2SO_4 . Das Ergebnis der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (1) ist als durchgezogene Linie gegeben. $C_b = 0.20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_b > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$. B) Spezifische Kapazitäten C_b von porösen Aluminatsubstraten, die nach verschiedenen Anodisierungsdauern t erhalten wurden.

Das Ergebnis, dass die elektrischen Parameter des porösen Aluminats ausschließlich durch die Barrierschicht bestimmt werden und das Kanalfeld nicht zur Impedanz beiträgt, wurde durch die Untersuchung von planarem Oxid bestätigt, das die gleiche Oxiddicke aufwies wie die Barrierschicht unter den Poren. Eine schematische

Darstellung des planaren Oxids mit der entsprechenden Nomenklatur der Schichten ist in Abb. 5.14 B gegeben.

Die Spektren eines planaren und eines porösen, ungeordneten Aluminats sind in Abb. 5.17 A dargestellt. Die Messungen wurden in 100 mM Na_2SO_4 durchgeführt. Eine Anpassung der Parameter von Ersatzschaltkreis (1) ergibt für das planare Oxid eine Kapazität C_b von $0.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen Widerstand größer $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$, für das poröse Aluminat Kapazität C_b von $0.19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen Widerstand größer $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$. Es wurden fast gleiche Impedanzspektren mit nahezu übereinstimmenden elektrischen Parametern für planare und poröse Oxide erhalten, was die Hypothese bestätigt, nur die Barrierschicht zu messen.

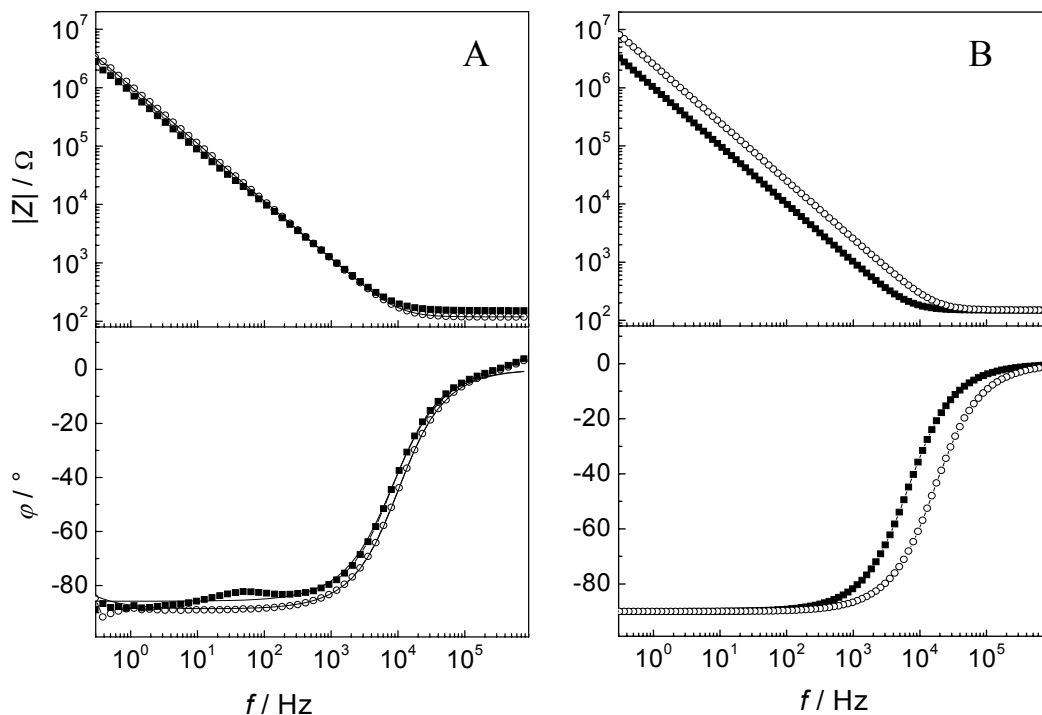


Abb. 5.17. A) Impedanzspektren von planarem Oxid (■) und ungeordnetem, porösem Oxid (○) in 100 mM Na_2SO_4 (Fläche 0.8 cm^2). Die Schichtdicke der planaren Barrierschicht und der Barrierschicht unter den Poren stimmen überein. Die Ergebnisse der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (1) sind als durchgezogene Linie gegeben. (■) $C_b = 0.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_b > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$, (○) $C_b = 0.19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_b > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$. B) Simulation der Impedanzspektren von planarem (■) und ungeordnetem, porösem Aluminat (○) für den Fall, dass die aktive Fläche der Porenfläche entspricht. Die angenommene Porösität betrug 40 %, die geometrische Fläche 0.8 cm^2 . Als Schaltbild wurde Ersatzschaltkreis (1a) verwendet. Es wurde eine spezifische Kapazität des Aluminats von $0.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und ein Elektrolytwiderstand von 150Ω angenommen.

Für den Fall, dass die aktive Fläche der Porenfläche entspricht und die Porenstege des porösen Substrats dementsprechend impedanzspektroskopisch nicht detektiert würden, sollte das Spektrum des porösen Substrates einen Unterschied zu dem Spektrum des planaren Substrats aufweisen. Dies wurde in einer Simulation verdeutlicht. Abb. 5.17 B zeigt die simulierten Impedanzspektren von planarem sowie ungeordnetem, porösem Aluminat für den Fall, dass die aktive Fläche der Porenfläche entspricht. Angenommen wurde eine Porösität von 40 % und eine Fläche von 0.8 cm^2 . Verwendet wurde Ersatzschaltbild (1a). Die angenommene spezifische Kapazität C_b betrug in Anlehnung an die durchgeführten Messungen $0.2 \text{ } \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Diese Kapazität wurde durch die Normierung auf die aktive Fläche, die der geometrischen Fläche entsprach, erhalten. Um die zu simulierende Kapazität für den Fall, dass die aktive Fläche nicht der geometrischen, sondern der Porenfläche entspricht, zu erhalten, muss die spezifische Kapazität von $0.2 \text{ } \mu\text{F}/\text{cm}^2$ mit der angenommenen aktiven Fläche multipliziert werden. Im Fall eines porösen Aluminats mit einer Porösität von 40 % und einer geometrischen Fläche von 0.8 cm^2 beträgt die aktive Fläche 0.32 cm^2 . Die zu simulierende Kapazität beträgt somit $0.06 \text{ } \mu\text{F}$. Im Fall einer planaren Probe würde die aktive Fläche der geometrischen Fläche von 0.8 cm^2 entsprechen. Die erhaltene Kapazität beträgt somit $0.16 \text{ } \mu\text{F}$. Die durchgeführte Simulation bestätigt, dass die Flächenunterschiede der aktiven Flächen von porösem und planarem Oxid, die für den Fall auftreten, dass die aktive Fläche der Porenfläche entspricht, zu deutlich erkennbaren Unterschieden der Spektren führt. Da diese Unterschiede im untersuchten System nicht auftraten, kann geschlossen werden, dass die aktive Fläche der Fläche entspricht, die durch den Dichtring begrenzt wird.

Ausdünnvorgang

Um einen sensitiven Nachweis der porenüberspannenden Lipidmembranen zu ermöglichen, müssen die kapazitiven und ohmschen Eigenschaften der Barrierschicht verändert werden (s. Kap. 5.2.3), da das Impedanzverhalten des Substrats nur durch diese Schicht bestimmt ist. Unter Annahme eines Plattenkondensators ist die Kapazität invers proportional zur Dicke d . Eine Verringerung der Dicke der Barrierschicht hat somit eine Vergrößerung der Kapazität C_b zur Folge. Um eine Verringerung der Dicke der Barriereoxidschicht zu erzielen, wurde im Anschluss an den erfolgten Anodisierungsprozess eine exponentiell abfallende Spannung an das poröse Aluminat in 0.3 M Oxalsäure angelegt. Die Anfangsspannung von 40 V wurde mit einer Zeitkonstanten τ von 40 Minuten bis auf 40 mV gesenkt. Abb. 5.18 A zeigt die Impedanzspektren eines ungeordneten, porösen Aluminats direkt nach dem Anodisierungsprozess und nach

dem Anlegen der exponentiell abfallenden Spannung. Die Endspannung betrug 1 V. Die Impedanzspektren des porösen Aluminats ändern sich durch den Ausdünnvorgang erheblich. Ein Anpassen der Parameter des Ersatzschaltkreises (1) an die Daten zeigt, dass die Kapazität C_b der Barrierschicht von $0.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf $4.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ gestiegen ist, während der Widerstand R_b von über $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ auf $13 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ gesunken ist. Die Änderung der elektrischen Parameter beweist, dass die Barrierschicht an den Porenböden ausgedünnt wurde.

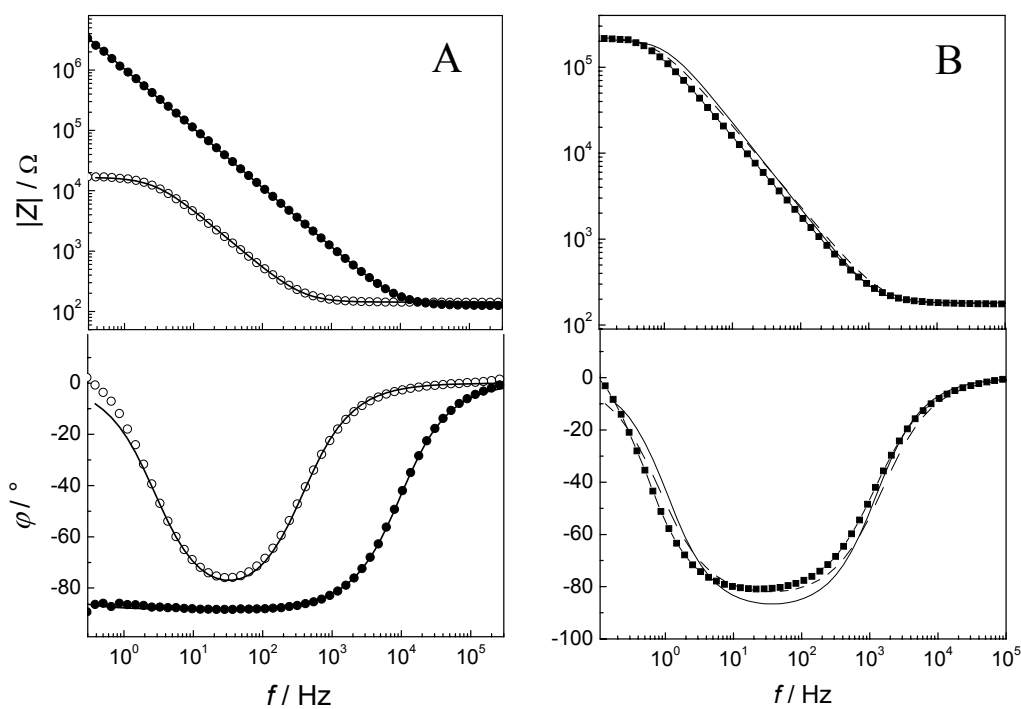


Abb. 5.18. A) Impedanzspektrum eines ungeordneten, porösen Aluminats direkt nach dem Anodisierungsprozess (●) und nach dem anschließenden Anlegen einer exponentiell abfallenden Spannung bis auf 1 V (○). Die Messungen wurden in 0.1 M Na_2SO_4 durchgeführt (Fläche 0.8 cm^2). Die Parameter von Ersatzschaltkreis (1) wurden mit folgenden Ergebnissen an die Daten angepasst: (●) $C_b = 0.20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_b > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$, (○) $C_b = 4.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_b = 13 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse aus der Anpassung. B) Impedanzspektrum eines ungeordneten, ausgedünnten, porösen Aluminats, die Endspannung des Ausdünnprozesses betrug 40 mV. Die Messung wurde in 0.1 M Na_2SO_4 durchgeführt (Fläche 0.3 cm^2). Eine Anpassung der Parameter von Ersatzschaltkreis (1) an die Daten ist als durchgezogene Linie gegeben und ergab folgende Werte: $C_b = 3.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_b = 63 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Die Anpassung der Parameter von Ersatzschaltkreis (2) an die Daten ist als gestrichelte Linie gegeben und lieferte folgende Werte: $A_b = 4.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.95$, $R_b = 68 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Abb. 5.18 B zeigt das Impedanzspektrum eines ungeordneten, porösen Aluminats, das im Anschluss an den Anodisierungsprozess ausgedünnt wurde. Die Endspannung des Ausdünnpzesses betrug 40 mV. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis einer Anpassung von Ersatzschaltkreis (1) an die Daten mit einer resultierenden Kapazität C_b von $3.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einem Widerstand R_b von $63 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Dieser Ersatzschaltkreis beschreibt die Daten jedoch nur unzureichend. Wie der Vergleich von Abb. 5.17 A und Abb. 5.18 A/ B zeigt, nimmt die Übereinstimmung zwischen Impedanzdaten und Anpassung bei den Spektren der porösen Aluminate, deren Barrierschicht ausgedünnt wurde, mit abnehmender Endspannung ab. Möglicherweise ist die abnehmende Übereinstimmung zwischen Daten und Anpassung auf eine vergrößerte Oberflächenrauigkeit zurückzuführen. Es wurde beschrieben, dass sich aufgrund des Ausdünnvorganges in den Porenböden nochmals kleine Poren bilden (Abb. 5.19) [82].

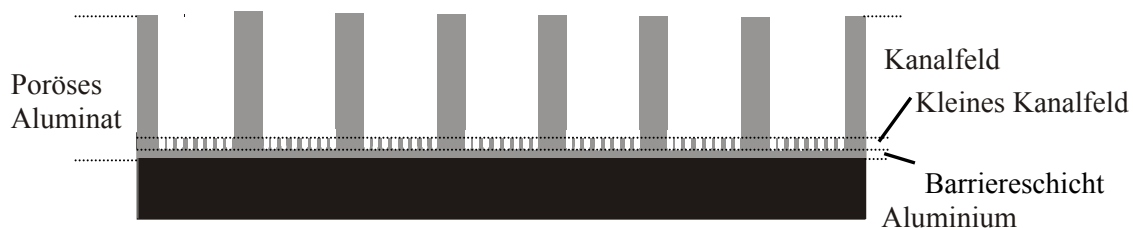


Abb. 5.19. Schematische Darstellung von porösem Aluminat, an das nach erfolgtem Anodisierungsprozess eine exponentiell abfallende Spannung mit einer Zeitkonstanten τ von 40 Minuten angelegt wurde. An den Porenböden entstehen kleine Poren und somit ein zweites, kleines Kanalfeld.

Es entsteht somit ein zweites kleines Kanalfeld, wobei die resultierende Barrierschicht dann dünner als vor dem Anlegen der exponentiell abfallenden Spannung ist. Dieses weitere Kanalfeld mit der dünneren Barrierschicht lässt sich über die effektive Mediumstheorie auf die gleiche Art und Weise beschreiben wie die poröse Schicht selbst. Die elektrolytgefüllten Dendritenporen an den Porenböden besitzen somit eine im Vergleich zur dünnen Barrierschicht vernachlässigbare Impedanz. Im Fall ausgedünnter Proben trägt daher nur die dünne Barrierschicht zum Impedanzverhalten des porösen Aluminatsubstrates bei.

Die in den Porenböden gebildeten kleinen Poren haben nicht nur eine Verringerung der Dicke der Barrierschicht zur Folge, sondern erhöhen auch dessen Rauigkeit. Daher wurde die Kapazität C_b durch das von Cole und Cole entwickelte *Constant Phase Element* (CPE) ersetzt [58]. Der Ursprung des CPE ist bislang noch ungeklärt,

es wird jedoch häufig mit einer erhöhten Oberflächenrauigkeit in Zusammenhang gebracht [55, 57]. Als weitere Ursachen werden erhöhte Anionenabsorption, Lösungsmittelleffekte und das Elektrodenpotential diskutiert [62, 68] (s. Kap. 3.1.3). Erneutes Anpassen des modifizierten Ersatzschaltkreises (2) aus Abb. 5.20 an das in Abb. 5.18 B gezeigte Spektrum ist als gestrichelte Linie gegeben und führt zu einem Wert A_b von $4.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, einem Wert α von 0.95 und einem Widerstand R_b von $68 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Die Übereinstimmung mit den Daten ist besser als bei einer Anpassung des Ersatzschaltkreises (1).

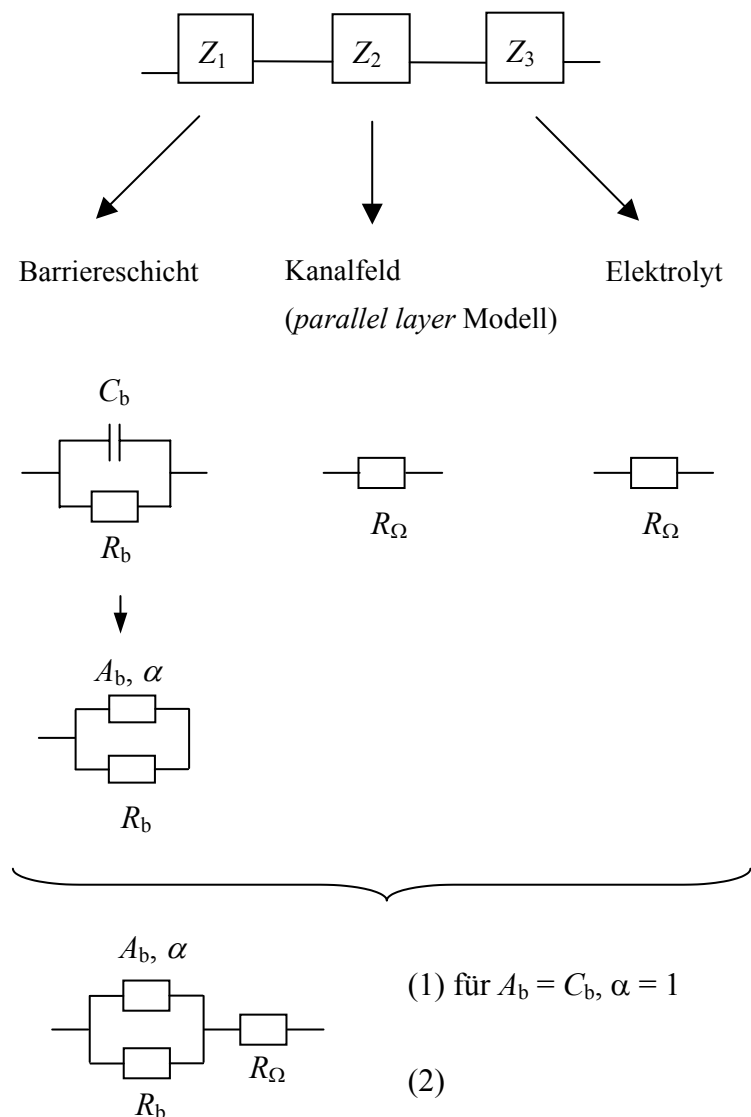


Abb. 5.20. Ersatzschaltkreis (2) zur impedanzspektroskopischen Beschreibung von ausgedünntem, porösem Aluminiumoxid. Für $\alpha = 1$ und damit $A_b = C_b$ geht Schaltkreis (2) in den in Abb. 5.15 dargestellten Ersatzschaltkreis (1) über.

Während des Ausdünnpzesses wurden mehrere Impedanzspektren aufgenommen. Die erhaltenen Werte für A_b^{-1} und α sind in Abb. 5.21 A/B in Abhängigkeit von der angelegten Endspannung dargestellt. Während A_b^{-1} linear mit der angelegten Spannung abnimmt, sinkt α nicht-linear von 0.99 im Bereich von 10 - 40 V auf 0.96 - 0.90 bei 10 - 50 mV. Aus der Steigung der in Abb. 5.21 A dargestellten Funktion lässt sich unter Annahme eines Plattenkondensators für die Barrierschicht und durch Gleichsetzen von $A_b = C_b$ die Ausdüntrate der Porenböden berechnen. In erster Näherung ist die Annahme $A_b = C_b$ gerechtfertigt, da α nur eine geringe Abweichung vom Wert 1 zeigt und somit ein kapazitives Verhalten der Barrierschicht anzeigt. Mit einer Dielektrizitätskonstanten von $\epsilon_{\text{AlOx}} = 9.0$ erhält man eine Ausdüntrate von 1 nm/V. Dieser Wert stimmt mit dem in der Literatur ermittelten Wert von 1.3 nm/V überein [82].

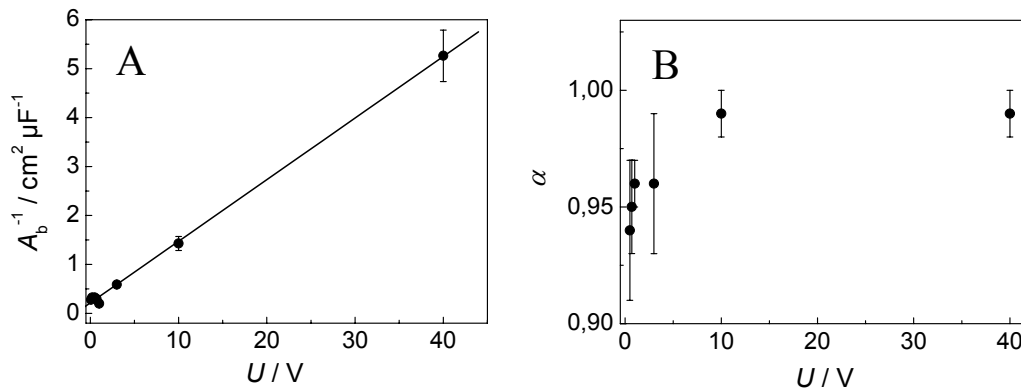


Abb. 5.21. A) Auftragung von A_b^{-1} gegen die angelegte Spannung U . Die Steigung wurde zu $m = 0.126 \text{ cm}^2/(\mu\text{F V})$ bestimmt. B) Auftragung von α gegen die angelegte Spannung U .

Werden die so präparierten porösen Aluminatsubstrate wässriger Lösung ausgesetzt, so ändern sich die elektrischen Parameter aufgrund der Bildung eines neuen dünnen Oxidfilms wiederum. Abb. 5.22 zeigt die zeitliche Veränderung der elektrischen Parameter bei Lagerung eines geordneten, porösen Substrates in 0.1 M Na_2SO_4 . Der Anfangswert für A_b von $4.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ sinkt innerhalb von 3 Stunden auf $2.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ab, während R_b deutlich von $21 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ auf $7.4 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ zunimmt. Der Wert α bleibt mit einem Wert von 0.97 über den untersuchten Zeitraum konstant. Nach etwa 3 Stunden werden keine weiteren Veränderungen des Wertes A_b der porösen Aluminate detektiert, es wird ein Gleichgewichtswert erreicht. Der Widerstand R_b steigt weiterhin an und erreicht innerhalb von 28 Stunden keinen Gleichgewichtswert. Da der Nachweis einer porenüberspannenden Lipidmembran im Wesentlichen über die Kapazität erfolgt, hat dies keinen Einfluss auf den Nachweis porenüberspannender

Lipidmembranen. Um ein Erreichen des Gleichgewichtszustandes des Wertes A_b bei allen Proben zu gewährleisten, wurden die porösen Aluminate für mindestens 4 Stunden in der für die nachfolgenden Messungen verwendeten Elektrolytlösung gelagert. Die erzielten Werte für A_b liegen im Bereich von $2.8 - 6.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und sind für eine Probe jeweils konstant. Die Werte für die ohmschen Widerstände variieren zwischen $30 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ und $7.4 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$.

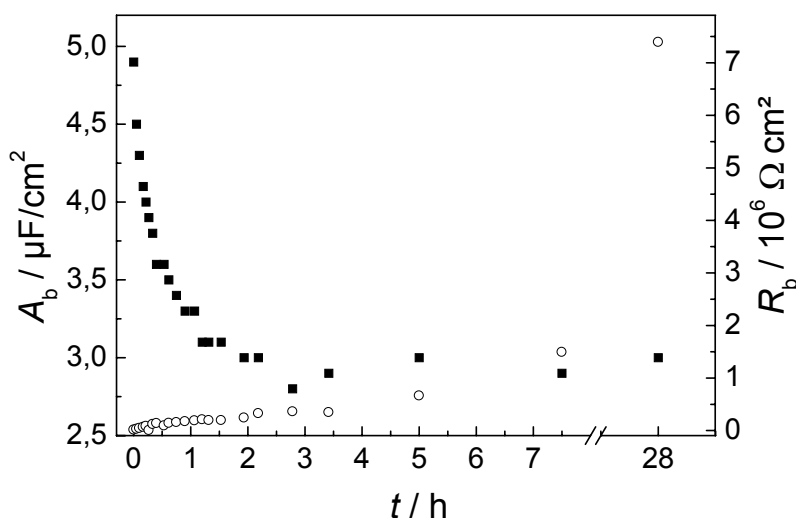


Abb. 5.22. A) Änderung des Wertes A_b (■) und des Widerstandes R_b (○) einer geordneten, porösen, ausgedünnten Aluminatprobe bei Lagerung in $0.1 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$. Der Ausdünnprozess wurde bei einer Spannung von 70 mV gestoppt. Der Wert α bleibt mit einem Wert von 0.97 über den untersuchten Zeitraum konstant. Der Wert A_b erreicht nach etwa 3 Stunden einen Gleichgewichtszustand, während der Widerstand R_b weiter ansteigt.

5.2 Charakterisierung von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten

Das Ziel der vorliegenden Arbeit liegt in der Präparation porenüberspannender Lipiddoppelschichten. Zur Untersuchung der Oberflächen und zum Nachweis porenüberspannender Lipidmembranen wurde im Wesentlichen die Impedanzspektroskopie eingesetzt, die eine Aussage über den Belegungsgrad des Substrates mit einer Lipidschicht erlaubt. Um die Struktur, in der die Lipide auf der Oberfläche vorliegen, zu untersuchen, wurden bei Proben, deren elektrischen Eigenschaften auf die Ausbildung einer Lipidmembran schließen lassen, zusätzlich

rasterkraftmikroskopische Aufnahmen aufgenommen. Diese bieten aufgrund der Höheninformation mit einer Auflösung im Å-Bereich eine gute Ergänzung zu den elektrochemischen Ergebnissen. Es ist somit möglich, sowohl den Belegungsgrad des porösen Substrates mit einer Lipidschicht zu bestimmen als auch die Art der ausgebildeten Lipidstruktur.

5.2.1 Theoretische Beschreibung festkörpergestützter Lipidmembranen

Einige Präparationstechniken zur Herstellung porenüberspannender Lipidmembranen wurden zunächst auf planaren Goldelektroden überprüft. Aus diesem Grund wird eine kurze theoretische Beschreibung festkörperunterstützter Lipidmembranen gegeben, deren elektrische Eigenschaften Gegenstand zahlreicher Untersuchungen sind. Der einfachste Ersatzschaltkreis zur Beschreibung einer Membranen besteht in der Parallelschaltung einer Kapazität C_m und einem Widerstand R_m . Wird eine Goldelektrode als Substrat verwendet, so bildet sich aufgrund der Polarisierbarkeit der Elektrode eine elektrochemische Doppelschicht aus, die einen kapazitiven Beitrag C_{el} zur Gesamtimpedanz leistet. Unter weiterer Berücksichtigung des Elektrolytwiderstandes R_Ω ergibt sich der in Abb. 5.23 A dargestellte Ersatzschaltkreis, der im weiteren als Ersatzschaltkreis (3) bezeichnet wird.

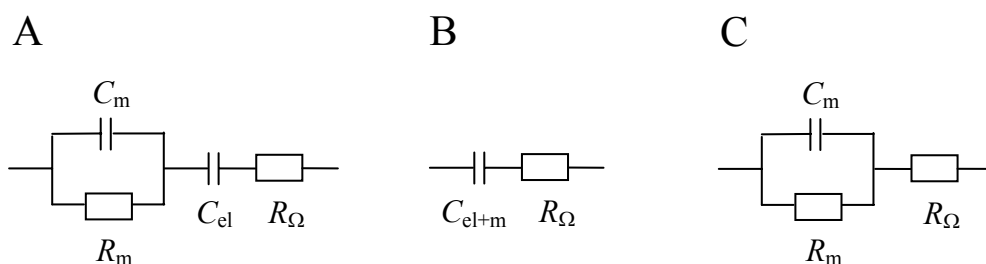


Abb. 5.23. Ersatzschaltbilder zur Beschreibung festkörpergestützter Lipidmembranen. A) Schaltbild (3) mit dem Membranwiderstand R_m , der Membrankapazität C_m , der Kapazität der elektrochemischen Doppelschicht C_{el} und dem Elektrolytwiderstand R_Ω . Ist der Widerstand R_m im beobachteten Frequenzfenster nicht mehr detektierbar, sind die Kapazitäten nicht unterscheidbar und der Ersatzschaltkreis vereinfacht sich zu dem in B gezeigten. B) Ersatzschaltkreis (4). Die Kapazität C_{el+m} setzt sich aus der Doppelschichtkapazität C_{el} und der Membrankapazität C_m zusammen. C) Ersatzschaltkreis (5). Die Kapazität C_{el} der elektrochemischen Doppelschicht ist im untersuchten Frequenzfenster nicht detektierbar.

Ist der Membranwiderstand zu hoch, um im untersuchten Frequenzfenster detektierbar zu sein, können die Kapazitäten C_m und C_{el} nicht voneinander unterschieden werden. In diesem Fall ergibt sich der in Abb. 5.23 B gezeigte Ersatzschaltkreis. Dieser Schaltkreis wird im weiteren als Ersatzschaltkreis (4) bezeichnet. Ist die Kapazität C_{el} der elektrochemischen Doppelschicht aufgrund eines großen Membranwiderstands R_m im untersuchten Frequenzfenster nicht mehr detektierbar, vereinfacht sich der in Abb. 5.23 A dargestellte Ersatzschaltkreis zu dem in Abb. 5.23 C gezeigten, der als Ersatzschaltkreis (5) bezeichnet wird.

Modifizierungen des einfachen Ersatzschaltbildes (3) zur Beschreibung einer SSM wurden von Wiegand et al. diskutiert. Sie beschreiben einen Ersatzschaltkreis für eine festkörperunterstützte Lipidmembran, der sich aus mehreren Parallelschaltungen aus Widerstand und Kapazität zusammensetzt [7]. Diese liegen in serieller Schaltung vor und berücksichtigen unterschiedliche elektrische Eigenschaften der verschiedenen Bereiche der Lipidmembran. So besitzen die Kopfgruppen der Lipide eine Kapazität von 10-100 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, für die hydrophoben Ketten liegt die Kapazität bei etwa 0.64 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Wiegand et al. verwendeten Ersatzschaltkreise mit bis zu sechs Parallelschaltungen zur Beschreibung der Membranen. Die mit diesem Ersatzschaltkreis erhaltenen Anpassungen weisen eine gute Übereinstimmung mit den von Wiegand et al. erhaltenen Daten auf, jedoch lassen sich die ermittelten elektrischen Parameter nur schwer mit Literaturdaten vergleichen. Auch ein Vergleich der Auswertungen verschiedener Messungen untereinander gestaltet sich recht schwierig.

5.2.2 Theoretische Beschreibung porenüberspannender Lipidmembranen

Zur Auswertung der gemessenen Impedanzspektren der porösen Aluminate nach Inkubation mit Vesikeln wird ein Modell benötigt, welches eine mathematische Beschreibung für die elektrische Systemantwort bietet. Zusätzlich zu dem porösen Aluminatsubstrat, dessen Impedanzantwort durch den Ersatzschaltkreis (2) in Abb. 5.20 dargestellt wird, müssen elektrische Elemente berücksichtigt werden, die die Lipiddoppelschicht beschreiben. Da der Strom sowohl über die Lipidmembran als auch über das Aluminatsubstrat geht, müssen die zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften der porenüberspannenden Membran und des porösen Substrats verwendeten Ersatzschaltkreise wie im Fall einer festkörperunterstützten Membran in einer seriellen Schaltung vorliegen. Eine Kombination des Ersatzschaltbildes, das eine Lipidschicht beschreibt mit dem, der das poröse Aluminat charakterisiert, liefert

das in Abb. 5.24 gezeigte Ersatzschaltbild (6). Die elektrischen Parameter, die das poröse Aluminat beschreiben, werden durch eine Messung des Substrates vor der Vesikelinkubation ermittelt und bei der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (6) an die nach der Vesikelinkubation erhaltenen Daten konstant gehalten. Die Konstanzhaltung der Parameter basiert auf der Annahme, dass die elektrischen Eigenschaften des porösen Aluminats durch die Inkubation mit Vesikeln nicht verändert werden.

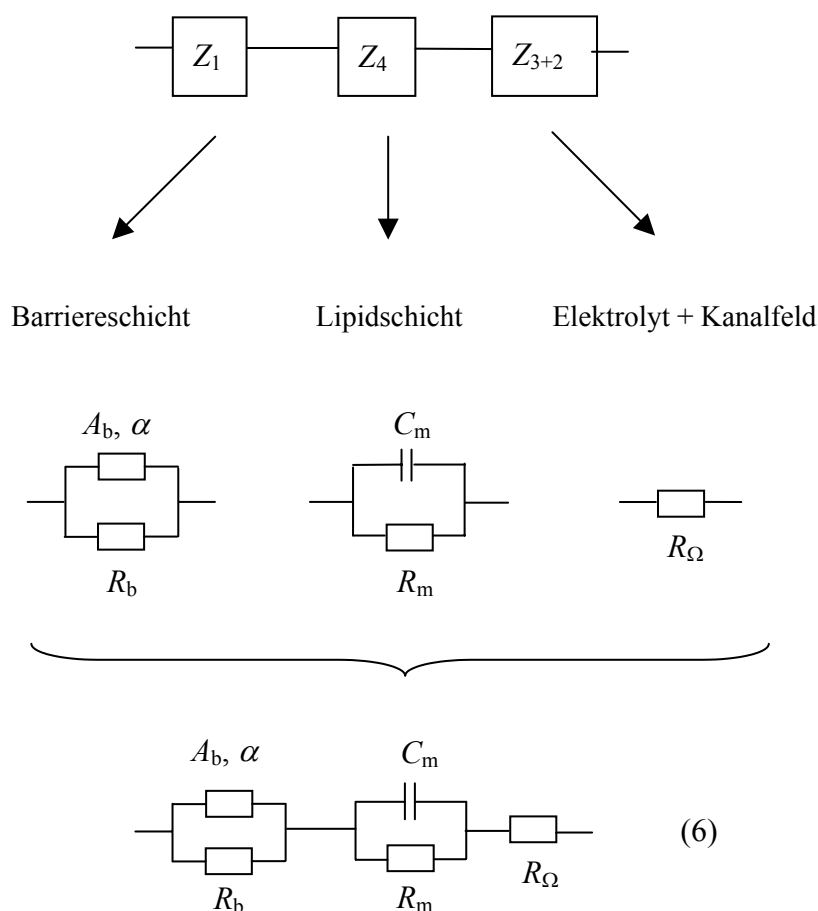


Abb. 5.24. Ersatzschaltkreis (6) zur Auswertung von Impedanzspektren von porösem Aluminat nach der Inkubation mit Vesikeln.

Eine Erweiterung des Ersatzschaltkreises (6), wie sie von Wiegand et al. für festkörpergestützte Lipidmembranen beschrieben wurde, ist in Abb. 5.25 dargestellt. Seriell zu den Impedanzelementen, die das poröse Aluminat repräsentieren, ist eine serielle Schaltung von drei parallelen RC-Gliedern angeordnet, die die

unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften der Kopfgruppen, der Fettsäureketten sowie der Gouy-Chapman-Stern-Schicht beschreiben.

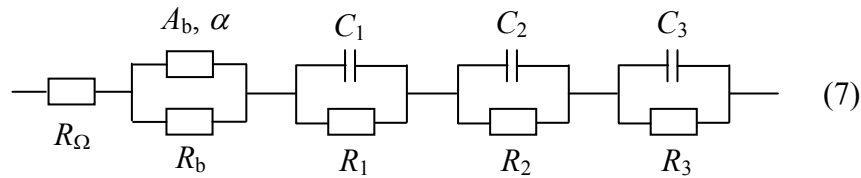


Abb. 5.25. Ersatzschaltkreis (7) zur Auswertung von Impedanzspektren von porösem Aluminat nach der Inkubation mit Vesikeln.

5.2.3 Impedanzspektroskopischer Nachweis idealer Lipidmembranen auf porösen Aluminaten

Um die Detektierbarkeit der porenüberspannenden Membranen auf den porösen Substraten mit Hilfe der Impedanzspektroskopie zu überprüfen, wurde zunächst ein Impedanzspektrum für eine ideale Lipidmembran mit einer Kapazität von $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [7, 44, 100] auf einem nicht ausgedünnten Aluminat simuliert. Das Ergebnis ist in Abb. 5.27 A gezeigt. Im Fall des Aluminats handelt es sich um das aufgenommene Spektrum eines porösen, ungeordneten, nicht ausgedünnten Aluminats, die elektrischen Parameter wurden durch die Anpassung der Parameter von Ersatzschaltkreis (1a) an die Daten erhalten. Die Kapazität C_b hat einen Wert von $0.21 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Das dargestellte Spektrum einer idealen Lipidschicht auf einem porösen Aluminat ist das Ergebnis einer Simulation, die auf der Annahme basiert, dass die Lipidschicht und das Aluminatsubstrat in einer seriellen Schaltung wie in Abb. 5.24 (Ersatzschaltbild (6)) gezeigt vorliegen.

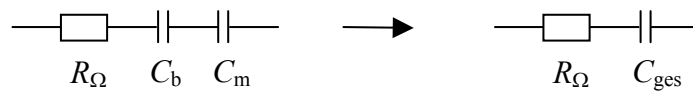


Abb. 5.26. Ersatzschaltkreise, die zur in Abb. 5.27 dargestellten Simulation verwendet wurden.

Unter Annahme eines Widerstandes R_m , der im untersuchten Frequenzfenster nicht mehr detektierbar ist, reduziert sich das Ersatzschaltbild der Lipidschicht auf eine Kapazität C_m (Abb. 5.26). Die Gesamtkapazität C_{ges} des Substrates und der Lipidschicht ergibt sich so zu

$$\frac{1}{C_{\text{ges}}} = \frac{1}{C_b} + \frac{1}{C_m} \quad (5.6)$$

Wie die in Abb. 5.27 A dargestellten erhaltenen Spektren zeigen, ist kein Unterschied zwischen dem Spektrum ohne und mit idealer Lipidschicht mit einer Kapazität C_m von $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ erkennbar. Demnach wäre ein sensibler Nachweis der porenüberspannenden Lipidmembran selbst bei einer idealen Belegung unter diesen Bedingungen nicht möglich.

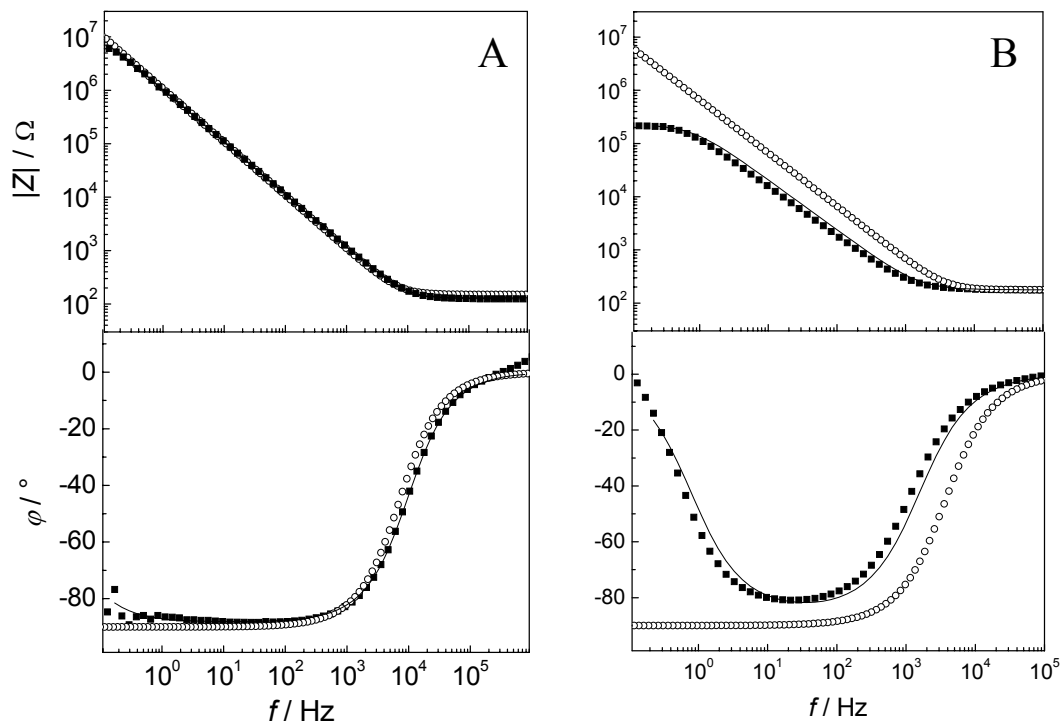


Abb. 5.27. A) Impedanzspektrum von ungeordnetem, nicht ausgedünntem, porösem Aluminat (■) in 100 mM Na_2SO_4 und Simulation einer idealen Lipidschicht (O) mit einer Kapazität von $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Fläche 0.8 cm^2). Das Ergebnis der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (1a) an die Daten des porösen Aluminats ist als durchgezogene Linie gegeben. (■) $C_b = 0.21 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Als Ersatzschaltkreis, der die Lipidschicht repräsentiert, wurde unter der Annahme, dass der Widerstand R_m im untersuchten Frequenzfenster nicht mehr detektierbar ist, eine Kapazität C_m angenommen, die mit dem Schaltkreis für das Aluminat in einer seriellen Schaltung vorliegt (s. Abb. 5.26). Es ist kein Unterschied zwischen den Spektren zu erkennen. B) Impedanzspektrum von ungeordnetem, ausgedünntem, porösem Aluminat (■) in 100 mM Na_2SO_4 und Simulation einer idealen Lipidschicht (O) mit einer Kapazität von $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Fläche 0.3 cm^2). Das Ergebnis der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (2) an die Daten des porösen Aluminats ist als durchgezogene Linie gegeben. (■) $A_b = 4.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.94$, $R_b = 70 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Der Unterschied zwischen den Spektren ist deutlich zu erkennen.

Um porenüberspannende Lipidmembranen mittels elektrochemischer Methoden sensitiv nachweisen zu können, muss die Kapazität des Aluminats, die im Wesentlichen durch die Barrierschicht gegeben ist, erhöht werden. Dies gelang durch den in Kap. 4.2.2 beschriebenen Ausdünnprozess. Abb. 5.27 B zeigt die Simulation einer idealen Lipidschicht mit einer Kapazität von $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf einem ausgedünnten Aluminatsubstrat. Im Fall des Substrats handelt es sich um das aufgenommene Spektrum eines porösen, ungeordneten, ausgedünnten Aluminats, die Ermittlung der elektrischen Parameter erfolgte durch die Anpassung der Parameter von Ersatzschaltkreis (2) an die Daten. A_b hat einen Wert von $4.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, der Wert α beträgt 0.94, der Widerstand R_b beträgt $70 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Das Impedanzspektrum einer simulierten Lipidschicht auf einem ausgedünnten Aluminat wurde unter den selben Bedingungen erhalten wie die in Abb. 5.27 A dargestellte. Es kann deutlich zwischen dem Spektrum des Aluminats und dem simulierten Spektrum einer idealen Lipidmembran auf dem porösen Aluminat unterschieden werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass auf den so präparierten porösen Aluminaten porenüberspannende Lipidmembranen nachgewiesen werden können.

5.2.4 Lipidmembranen auf funktionalisierten Oberflächen

Ein erster Ansatz zur Präparation porenüberspannender Lipidmembranen bestand in der Funktionalisierung der goldbedeckten Porenstege des porösen Aluminatsubstrats mit 3-Mercaptopropionsäure (MPA), so dass eine negativ geladene Oberfläche erhalten wurde, und dem anschließenden Spreiten von positiv geladenem N,N-Dioctadecyl-N,N-dimethylammoniumbromid (DODAB). Die Präparation wurde in Anlehnung an die von Hennesthal und Steinem [50] durchgeführt und die erhaltenen Oberflächen mittels Impedanzspektroskopie untersucht. Hennesthal und Steinem konnten unter Verwendung von DODAB rasterkraftmikroskopisch die prinzipielle Möglichkeit zeigen, porenüberspannende Lipiddoppelschichten auf porösem Aluminat herzustellen. Die erhaltenen Lipidmembranen wiesen eine gute Stabilität auf und waren über mehrere Stunden stabil. Die nominelle Größe der Vesikel betrug 100 nm, was nach MacDonald et al. Vesikeldurchmessern von $(80 \pm 25) \text{ nm}$ entspricht [23]. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Vesikel aufgrund des Größenausschlusses nicht in die $(35 \pm 8) \text{ nm}$ großen Poren diffundieren können¹³. Bei einer Untersuchung der porösen Aluminate mittels

¹³ Da sowohl ungeordnete als auch geordnete Poren verwendet wurden, wird hier Bezug auf die für aufgeweitete, geordnete Substrate ermittelte Porengröße genommen, da die so hergestellten Poren die größten Durchmesser aufweisen.

Impedanzspektroskopie wurde jedoch - analog zur Verwendung von halogenhaltigen Elektrolyten – aufgrund des im DODAB enthaltenen Bromids kein stabiles Impedanzspektrum erhalten. In einer Fällungsreaktion wurde daher versucht, Bromid (Br^-) durch Nitrat (NO_3^-) zu ersetzen. Dazu wurde eine Silbernitratlösung (AgNO_3) zu dem in Methanol gelösten DODAB gegeben und das gefällte Silberbromid durch Filtration und Zentrifugation entfernt¹⁴. Das durch diese Austauschreaktion erhaltene Lipid wird im weiteren als DODAN (N,N-Dioctadecyl-N,N-dimethylammoniumnitrat) bezeichnet. Um ausschließen zu können, dass überschüssige Ag^+ - und NO_3^- -Ionen die Oberflächenladung abschirmen und damit das Spreiten der Vesikel verhindern, wurden zunächst planare, mit MPA funktionalisierte Goldelektroden mit 100 nm DODAN-Vesikeln inkubiert. Die Kapazitäten der erhaltenen Lipiddoppelschichten betrugen 1.1 bis 1.2 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und sind identisch mit den von Steinem et al. für DODAB erhaltenen [101]. Die Widerstände liegen im Bereich von 300 $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$.

Bei der Übertragung dieser Präparationsmethode auf das poröse Aluminat und der anschließenden impedanzspektroskopischen Untersuchung zeigte sich eine Verschiebung des Impedanzspektrums nach der Inkubation mit Vesikeln zu niedrigeren Frequenzen (Abb. 5.28 A). Die in Abb. 5.28 B dargestellte Messung bei konstanter Frequenz f von 1 Hz während der Inkubation des Aluminats mit Vesikeln lässt eine sprunghafte Veränderung sowohl des Betrages der Impedanz $|Z|$ als auch der Phasenverschiebung φ erkennen. Dies weist darauf hin, dass die Fällungsreaktion nicht vollständig verlaufen ist und Spuren von Bromid ausreichen, um die elektrische Instabilität des porösen Aluminats zu bewirken.

Die Verwendung von positiv geladenen Lipiden kann aufgrund der oftmals enthaltenen Halogenid-Gegenionen eine Veränderung der elektrochemischen Eigenschaften des porösen Aluminats hervorrufen, was eine elektrische Charakterisierung der porenüberspannenden Membranen ausschließt. Aus diesem Grund wurde die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Lipiden und porösem Substrat in einem weiteren Ansatz über die Verwendung von negativ geladenen Lipiden realisiert. Die Funktionalisierung der oberen Oberfläche des porösen Aluminats erfolgte über Goldbeschichtung und Chemisorption von 11-Amino-undecanthiol (MUA, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{NH}_2$), das auf Gold über einen *self-assembly*-Prozess definierte Schichten ausbildet und bei einem pH-Wert von 5.0 zu über 99 % in der protonierten Form vorliegt.

¹⁴ Es wurde 1 ml der Silbernitratlösung (AgNO_3) ($c = 10 \text{ mg/ml}$ in Methanol) zu 2 ml des in Methanol gelösten DODAB ($c = 10 \text{ mg/ml}$) gegeben.

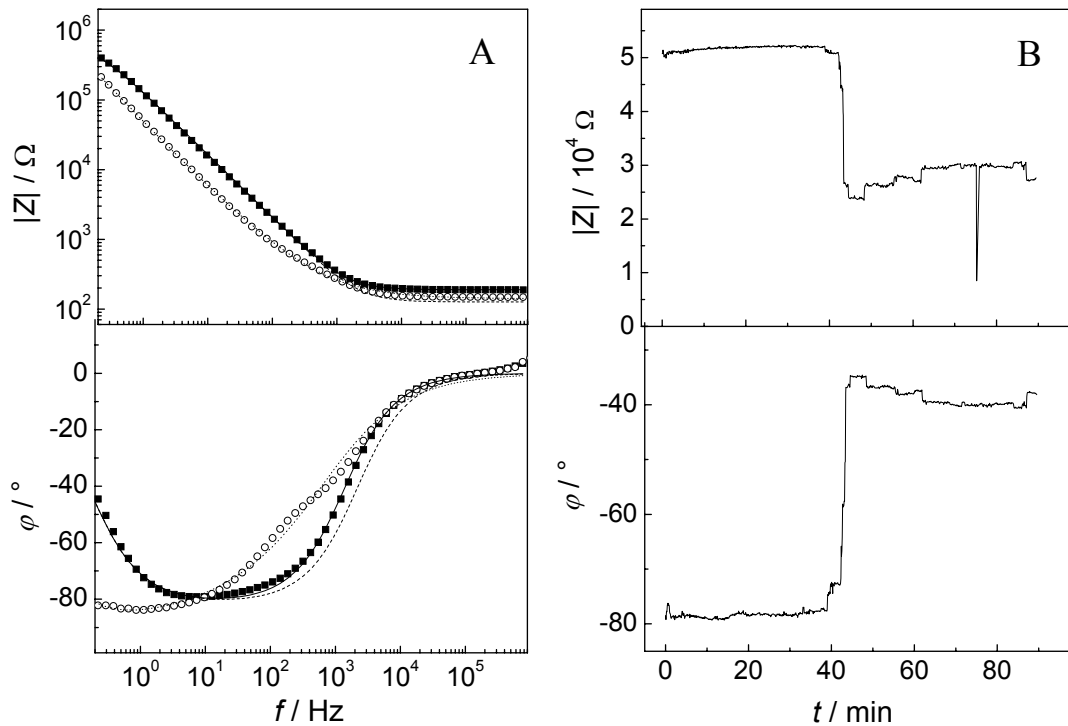


Abb. 5.28. DODAN auf ungeordnetem, ausgedünntem, porösem Aluminat, das mit 25 nm Gold belegt und mit MPA funktionalisiert wurde. A) Impedanzspektrum von mit MPA funktionalisiertem Aluminat vor (■) und nach der Inkubation mit DODAN-Vesikeln (○). Die Messung wurde in 10 mM Tris mit 100 mM Na₂SO₄ durchgeführt (Fläche 0.3 cm²). (■) Ersatzschaltkreis (2) wurde zur Auswertung der Impedanzspektren des porösen Aluminatsubstrates verwendet mit den folgenden Ergebnissen: (-) $A_b = 4.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.91$, $R_b = 207 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. B) Impedanzspektroskopische Messung von porösem Aluminat während der Inkubation mit DODAN-Vesikeln bei einer Frequenz f von 1 Hz. Die Messung wurde in 10 mM Tris mit 100 mM Na₂SO₄ durchgeführt (Fläche 0.3 cm²).

Als Lipid wurde 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) verwendet. Um eine Diffusion der Vesikel in die Poren zu vermeiden, wurde eine nominelle Vesikelgröße von 400 nm gewählt. Die Vesikel sind damit um einen Faktor 11 größer als die Poren mit einer Größe von (35 ± 8) nm. Zum Vergleich und zur Überprüfung der Selbstorganisationsprozesse wurden Schichten zunächst auf planaren Goldelektroden präpariert. Die erhaltenen Impedanzspektren wurden mit dem Ersatzschaltbild (4) ausgewertet und lieferten eine Kapazität $C_{\text{el+m}}$ von $3.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die Elektrode nach der Funktionalisierung mit MUA und $0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ nach Inkubation mit unilamellaren DMPG-Vesikeln. Die Kapazität von $0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ entspricht dem für eine defektarme Lipiddoppelschicht erwarteten Wert. Der Widerstand R_m der Lipidmembran auf der Elektrode betrug $57 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Eine Übertragung der Präparationstechnik auf poröse Aluminate lieferte hingegen keinen im Spektrum erkennbaren Unterschied zwischen dem Impedanzspektrum des

porösen Aluminats vor und nach der Inkubation mit den Vesikeln. Eine Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (6) an die erhaltenen Daten lieferte eine Kapazität C_m des Substrates nach Inkubation mit Vesikeln von $8.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen Widerstand R_m von $65 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Die hohe Membrankapazität C_m beweist, dass die Vesikel keine elektrisch dichte oberflächengebundene Doppelschicht ausbilden. Ein Grund für die fehlende Ausbildung der Lipiddoppelschicht wurde in der zu geringen Oberflächenladungsdichte vermutet, da eine Funktionalisierung mit MUA lediglich auf den Porenstegen stattfindet und nicht wie im Fall des Goldsubstrates auf der gesamten Oberfläche.

5.2.5 Fusion von *Giant Vesicles*

Die impedanzspektroskopischen Untersuchungen von porösen Aluminaten, die funktionalisiert und mit Vesikeln inkubiert wurden, ließen keine Veränderungen zwischen den Spektren des Substrates vor und nach der Vesikelinkubation erkennen, was darauf schließen lässt, dass die Vesikel keine oberflächengebundene Doppelschicht ausbilden. In einem anderen Ansatz wurde die Präparation von planaren Lipiddoppelschichten auf porösen Oberflächen ausgehend von unilamellaren *Giant Vesicles* untersucht, die prinzipiell die Bildung einzelner porenüberspannender Lipiddoppelschichten über Vesikelspreiten und -fusion erlauben sollte. In Anlehnung an die Arbeit von Schmidt et al. wurden Vesikel mit folgenden Lipidzusammensetzungen hergestellt [43]:

Mischung 1: 70 w% Asolectin

25 w% 1,2-**D**imyristoyl-*sn*-glycero-3-**p**hosphoglycerol (DMPG)

5 w% Cholesterol

Mischung 2: 70 w% Asolectin

1-**P**almitoyl-2-**o**leoyl-*sn*-glycero-3-**p**hosphoglycerol (POPG)

5 w% Cholesterol

Bei Zugabe von wässriger Lösung quillt der Lipidfilm auf, durch die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Lipidschichten bilden sich unilamellare *Giant Vesicles* aus. Zur Überprüfung der Ausbildung der Vesikel sowie zur Bestimmung ihrer Größe wurde die erhaltene Vesikelsuspension zunächst unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierfür wurde den Vesikeln 1 mol% β – *Bodipy*

beigefügt. Wie Abb. 5.29 erkennen lässt, betragen die Vesikelgrößen bis zu 25 μm . Die Größe dieser Vesikel übersteigt die Porengröße von (35 ± 8) nm um einen Faktor von bis zu 700 und gewährleistet somit einen Ausschluss der Vesikel aus den Poren. Eine Auswertung der Größenverteilung der Vesikel kann anhand von konfokalen Aufnahmen nicht durchgeführt werden, da die Aufnahme lediglich eine einzelne Fokusebene der Vesikelsuspension zeigt. Die in der Aufnahme erscheinende Größe der Vesikel ist damit von der Lage des Vesikels zur Fokusebene abhängig und muss nicht mit der reellen Größe übereinstimmen.

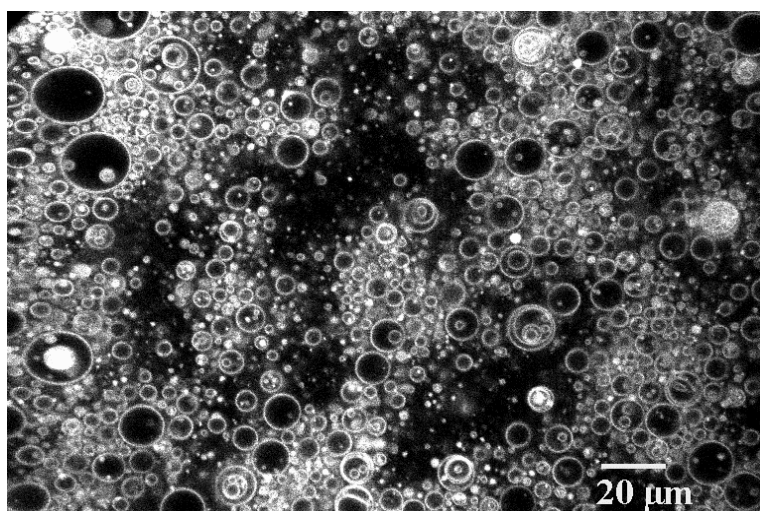


Abb. 5.29. Konfokale Fluoreszenzmikroskop-Aufnahme von *Giant Vesicles* aus 70 w% Asolectin, 25 w% POPG, 5 w% Cholesterol und 1 mol% β – Bodipy. Die Größe der Vesikel beträgt bis zu 25 μm .

In einem ersten Ansatz wurden poröse Aluminate mit einer dünnen Goldschicht belegt, die eine Voraussetzung für die Chemisorption von 3-Mercaptoethanolamin (MEA) bietet. Bei einem pH-Wert von 5.5 liegt diese chemisorbierte Monoschicht zu über 99 % in der protonierten Form vor [2], so dass negativ geladene *Giant Vesicles* an der Oberfläche adhäreren und zu planaren Doppelschichten spreiten können.

Impedanzspektren wurden vor und nach der Inkubation der Oberfläche mit *Giant Vesicles* aufgenommen. Nach der Inkubation wurde keine Veränderung im Impedanzspektrum des Systems festgestellt, was darauf hinweist, dass die Vesikel keine elektrisch dichte oberflächengebundene Doppelschicht ausbilden. In einem weiteren Ansatz wurden daher unbedampfte, poröse Aluminate für 16 Stunden mit negativ geladenen *Giant Vesicles* inkubiert, während eine positive Spannung von +100 mV an das Substrat angelegt wurde. Wiederum wurden Impedanzspektren vor

und nach dem Inkubationsprozess aufgenommen. Nach der Inkubation wies das Impedanzspektrum eine deutliche Veränderung auf, die auf die Bildung einer Lipidschicht hinweisen könnte (Abb. 5.30 A).

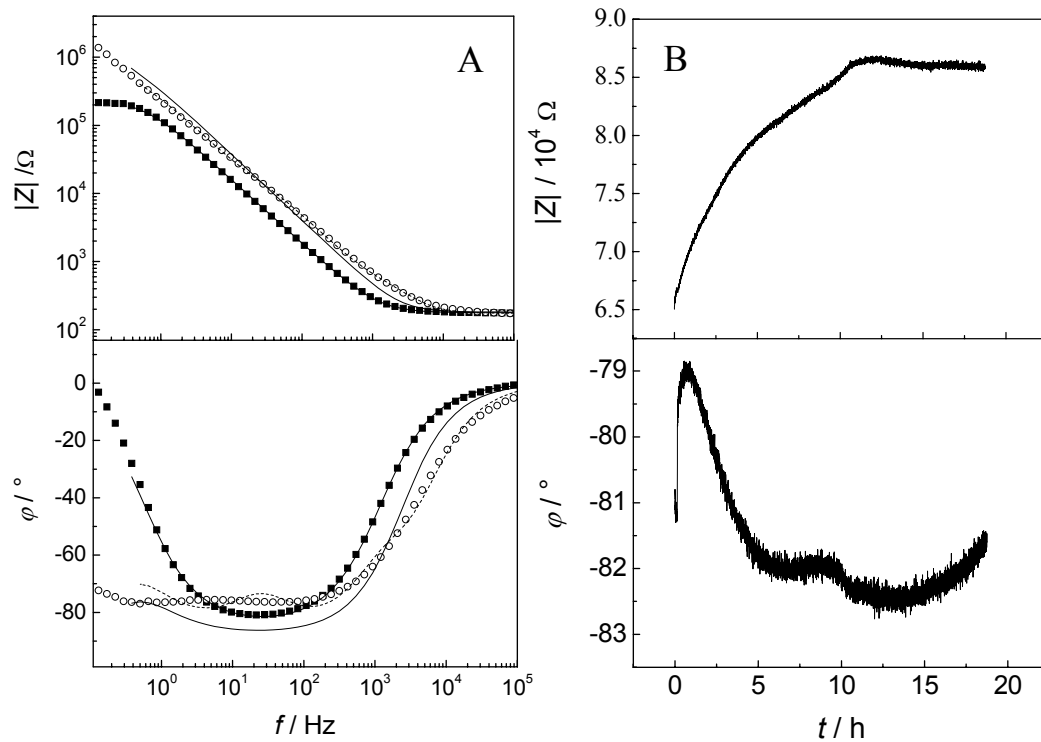


Abb. 5.30. A) Impedanzspektrum eines ungeordneten, ausgedünnten, porösen Aluminatsubstrats vor (■) und nach (○) der Inkubation mit *Giant Vesicles*, während der für 16 h eine Spannung von +100 mV an das Substrat angelegt wurde. (■) Ersatzschaltkreis (2) wurde zur Auswertung der Impedanzspektren des porösen Aluminatsubstrates verwendet mit den folgenden Ergebnissen: $A_b = 4.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.94$, $R_b = 71 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. (○) Ersatzschaltkreis (6) wurde zur Auswertung des Impedanzspektrums verwendet, das nach der Inkubation des Substrats mit Vesikeln erhalten wurde: (–) $C_m = 2.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und $R_m > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$. Ersatzschaltkreis (7) wurde zur Auswertung verwendet mit folgenden Ergebnissen (---): $C_1 = 1.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $C_2 = 4.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $C_3 = 3.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_1 = 49.8 \Omega \text{ cm}^2$, $R_2 > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$, $R_3 = 1.5 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. B) Änderung des Betrages der Impedanz $|Z|$ und der Phasenverschiebung φ während eines Inkubationsprozesses von *Giant Vesicles* auf ungeordnetem porösen Aluminat. Die Messung wurde bei einer konstanten Frequenz f von 1 Hz und einer am Substrat anliegenden Spannung von +100 mV durchgeführt.

Kontrollexperimente, in denen *Giant Vesicles* ohne Anlegen einer Spannung auf porösen Aluminaten inkubiert wurden und solche, in denen poröse Aluminate bei einer anliegenden Spannung von +100 mV in einer wässrigen Lösung inkubiert wurden, zeigten kein verändertes Impedanzspektrum nach dem Inkubationsprozess.

Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass sich unter den oben genannten Bedingungen eine Lipiddoppelschicht auf dem porösen Aluminat ausgebildet hat.

Das Ergebnis der Anpassung des Ersatzschaltkreises (6) an die Daten ist als durchgezogene Linie gegeben. Sie zeigt nur eine bedingte Übereinstimmung zwischen Daten und Modell (Abb. 5.30 A) mit einem Kapazitätswert C_b von $2.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einem Membranwiderstand R_m größer $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$. Während der Anpassung wurden die elektrischen Parameter des porösen Aluminatsubstrats konstant gehalten, da angenommen wird, dass sie während des Inkubationsprozesses nicht verändert werden. Diese Annahme wurde durch die Kontrollversuche experimentell bestätigt. Der erhaltene Kapazitätswert der Lipidschicht auf porösem Aluminat ist um einen Faktor 2-3 größer als die einer defektarmen festkörpergestützten Lipiddoppelschicht, die typischerweise eine spezifische Kapazität von 0.8 bis $1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ aufweist [2]. Die größere Kapazität lässt auf eine unvollständige Bedeckung der Oberfläche mit Lipidschicht schließen. Eine Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (7) an die Daten ist als gestrichelte Linie gegeben. Sie liefert eine bessere Übereinstimmung zwischen Daten und Anpassung mit den folgenden Parametern: $C_1 = 1.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $C_2 = 4.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $C_3 = 3.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_1 = 49.8 \Omega \text{ cm}^2$, $R_2 > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$, $R_3 = 1,5 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Die Anpassung berücksichtigt die unterschiedlichen Kapazitäten der Lipidkopfgruppen, der hydrophoben Fettsäureketten sowie der elektrochemischen Doppelschicht. Eine Aussage über die Vollständigkeit der Membran ist aufgrund der Vielzahl der Parameter jedoch nicht möglich.

Eine zeitaufgelöste Messung bei konstanter Frequenz f von 1 Hz während der Inkubation des Aluminats mit Vesikeln bei einer am Substrat anliegenden Spannung von $+100 \text{ mV}$ zeigt, dass der Betrag der Impedanz $|Z|$ im Laufe des Inkubationsprozesses ansteigt und die Phasenverschiebung φ sinkt (Abb. 5.30 B). Die Änderung der Phasenverschiebung ist im Gegensatz zu der Änderung des Betrages der Impedanz relativ gering. Dies ist auf einen hohen Widerstand R_b des verwendeten Aluminats zurückzuführen. Die Änderungen weisen auf die teilweise Ausbildung einer Lipidschicht auf dem Substrat hin.

Um die Wahrscheinlichkeit für ein Aufspreiten der *Giant Vesicles* zu vergrößern, wurden die Vesikel in Anlehnung an Schmidt et al. in 200 mM Sorbitol präpariert und das umgebende Medium auf einer Säule durch Reinstwasser ersetzt [43]. Durch den osmotischen Druck sollte das Aufplatzen der Vesikel unterstützt werden. Impedanzspektroskopische Untersuchungen von porösen Aluminaten, die mit in Sorbitol präparierten *Giant Vesicles* inkubiert wurden, zeigen ein verändertes Spektrum nach der Inkubation mit den Vesikeln im Vergleich zu dem des porösen Substrats. Aufgrund der besseren Vergleichsmöglichkeiten der Ergebnisse

untereinander wurde die Auswertung der Daten mit Hilfe der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes (6) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.1 gegeben. Es wurde eine Kapazität C_m von $(8.3 \pm 0.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und ein Widerstand $R_m > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ erhalten. Kontrollexperimente, in denen poröse Aluminate bei einer anliegenden Spannung von +100 mV in 200 mM Sorbitol inkubiert wurden, zeigten kein verändertes Impedanzspektrum nach dem Inkubationsprozess. Dies lässt darauf schließen, dass das veränderte Impedanzspektrum auf die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht zurückzuführen ist.

Um eine Verbesserung der Bedeckung zu erhalten, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, die Ladungsdichte der Vesikel zu erhöhen, um die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Vesikeln und Substrat zu erhöhen. Es wurden *Giant Vesicles* aus 95 w % negativ geladenem DMPG und 5 w % Cholesterol hergestellt. Eine Untersuchung der Vesikelsuspension mit dem konfokalen Mikroskop ergab jedoch, dass diese Zusammensetzung keine Vesikel bildet. Die Lipide bilden vielmehr große unregelmäßige Aggregate, so dass auf Basis dieser Lipidmischungen keine Membranpräparationen durchgeführt werden konnten.

Ein weiterer Faktor, der das Spreiten von Vesikeln beeinflusst, ist ihre Größe. Um dies näher zu untersuchen, wurden sowohl poröse Aluminate untersucht, die mit Vesikeln inkubiert wurden, welche über die Extrusionsmethode hergestellt wurden und eine nominelle Größe von 1 μm besaßen, als auch Aluminate, die mit *Giant Vesicles* inkubiert wurden, deren Durchmesser zwischen 3 μm und 25 μm lagen. Die Abtrennung der Vesikel, die eine Größe über 3 μm aufwiesen, erfolgte durch ein Siebverfahren. Die Vesikel wurden in ein Transwell-Sieb in einem Wasserreservoir gegeben, das eine Maschengröße von 3 μm besaß. Durch permanentes Rühren und mehrmaliges Austauschen des umgebenden Wassers diffundieren die kleinen Vesikel durch das Sieb, während die großen zurückgehalten werden. Eine impedanzspektroskopische Untersuchung von porösen Aluminaten, die mit *Giant Vesicles* $> 3 \mu\text{m}$ bzw. $< 1 \mu\text{m}$ inkubiert wurden, zeigt eine deutliche Veränderung des Spektrums im Vergleich zu dem des porösen Substrats. Die Kapazität des Substrats nach der Vesikelinkubation wurde über eine Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes (6) an die Daten erhalten und ist in Tab. 5.1 gegeben. Für Vesikelgrößen über 3 μm wurde eine Kapazität C_m von $(2.5 \pm 0.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und ein Widerstand $R_m > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ erhalten. Die Inkubation mit Vesikeln einer nominellen Größe von 1 μm ergab eine Kapazität C_m von $(4.0 \pm 0.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen Widerstand R_m von $6.9 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Singer et al. und Demel et al. fanden, dass Cholesterol auf die Vesikel einen stabilisierenden Einfluss hat [10, 102]. In einem weiteren Ansatz wurde das in den *Giant Vesicles* enthaltene Cholesterol durch 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-

Phosphocholin (Lyso-PC) ersetzt, von dem vermutet wird, dass es das Spreitverhalten fördert. Die Bildung und die Stabilität der so präparierten Vesikel wurde über das konfokale Mikroskop überprüft, die resultierenden Vesikel sind analog zu den Cholesterol-haltigen Vesikeln bis zu 25 μm groß und über mehrere Tage stabil. Das Spreitverhalten dieser Vesikel wurde zunächst auf planaren Goldelektroden überprüft. Die erreichten Kapazitäten liegen bei $2.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und sind damit etwa um einen Faktor 2 größer als die für eine defektarme Membran erwarteten Kapazitäten. Eine Übertragung dieser Präparationsmethode auf poröses Aluminat liefert die in Tab. 5.1 angegebene Kapazität C_m von $(3.8 \pm 1.0) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen Widerstand $R_m > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$.

Tab. 5.1. Membrankapazitäten C_m und Widerstände R_m , die nach Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (6) an die Daten aus verschiedenen Präparationen erhalten wurden. 1) Die porösen Aluminate wurden mit bis zu 25 μm großen *Giant Vesicles* inkubiert, die in Reinstwasser präpariert wurden. 2) Die Aluminatprobe wurde mit Vesikeln inkubiert, die in Reinstwasser mittels der Extrusionsmethode präpariert wurden. Der nominelle Durchmesser betrug 1 μm . 3) Die zur Inkubation verwendeten Vesikel besaßen eine Größe von über 3 μm und wurden in Reinstwasser präpariert. 4) Das in den *Giant Vesicles* enthaltene Cholesterol wurde gegen Lyso-PC ausgetauscht. 5) Die *Giant Vesicles* wurden in 200 mM Sorbitol präpariert und das umgebende Medium auf einer Säule gegen Reinstwasser ersetzt.

	$C_m [\mu\text{F}/\text{cm}^2]$	$R_m [\text{k}\Omega \text{ cm}^2]$
1) <i>Giant Vesicles</i>	2.4 ± 0.2	$> 10^4$
2) Vesikelgröße 1 μm	4.0 ± 0.2	6900
3) Vesikelgröße $> 3 \mu\text{m}$	2.5 ± 0.2	$> 10^4$
4) Lyso-PC-haltige <i>Giant Vesicles</i>	3.8 ± 1.0	$> 10^4$
5) <i>Giant Vesicles</i> mit osmotischem Druck	8.3 ± 0.2	$> 10^4$

Rasterkraftmikroskopie

Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften von *Giant Vesicles* auf porösem Aluminat haben gezeigt, dass ein verändertes Impedanzverhalten nach Inkubation mit den *Giant Vesicles* zu beobachten war, was auf die Ausbildung von Lipidmembranen schließen lässt. Da jedoch keine vollständige Belegung erzielt werden konnte und nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Vesikel auf der Probe von einer Doppelschicht abweichende Strukturen ausbilden, wurden rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an diesen Proben durchgeführt. Abb. 5.31 A/ C zeigt die topographische Oberfläche eines geordneten, porösen Aluminats nach Inkubation mit *Giant Vesicles*, die sich aus 65 w% Asolectin, 25 w% POPG, 5 w% Cholesterol und 5 w% Lyso-PC zusammensetzten ($3.1 \times 3.1 \mu\text{m}^2$). Die Aufnahme lässt die ursprünglich runde Form der Vesikel erkennen. Zur Verdeutlichung ist der

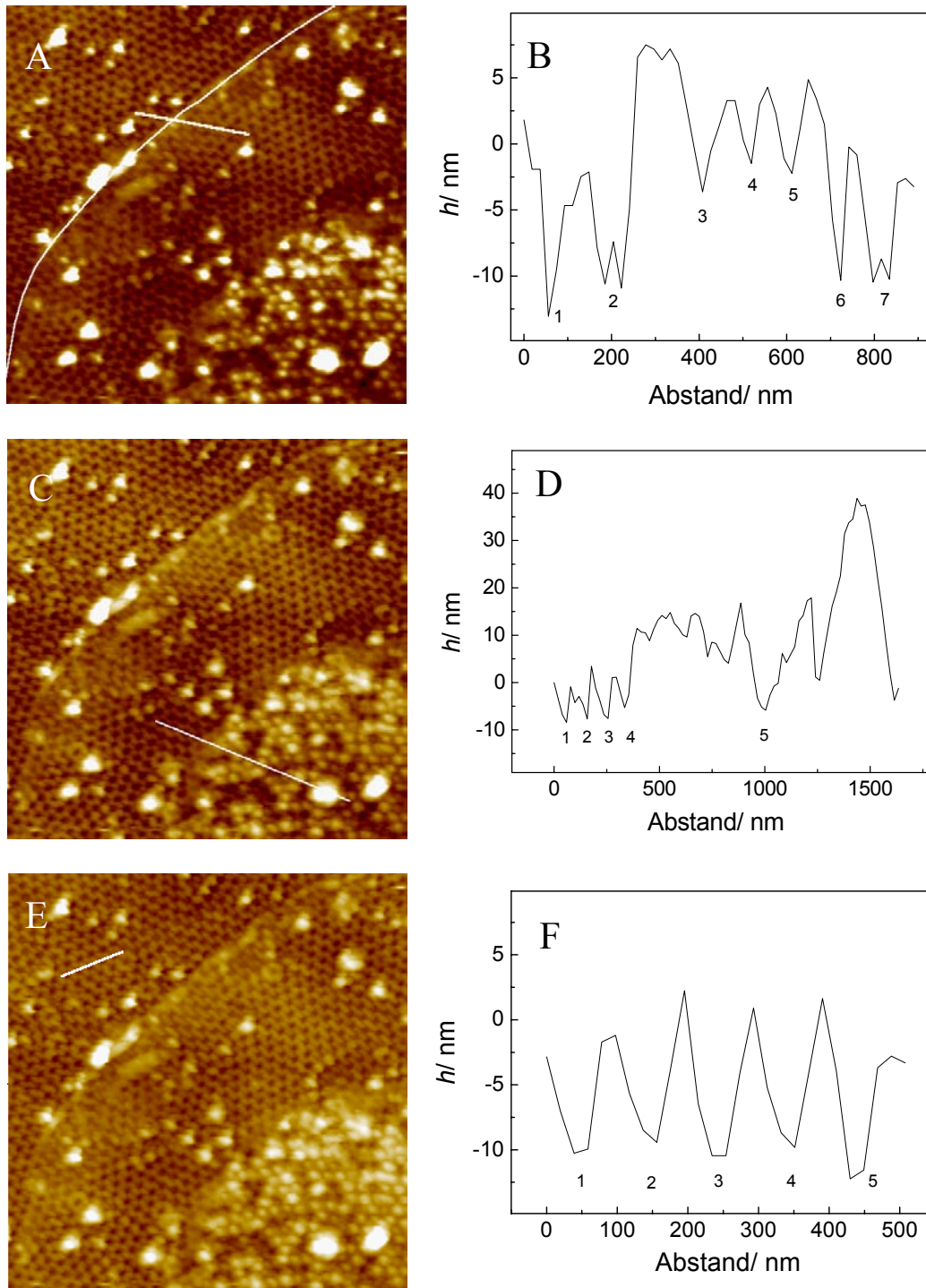


Abb. 5.31. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Contact-Mode*) einer porösen, geordneten, aufgeweiteten Aluminatoberfläche nach Inkubation mit *Giant Vesicles* (65 w% Asolectin, 25 w% POPG, 5 w% Cholesterol, 5 w% Lyso-PC). Die Konzentration der Lipidsuspension betrug $c = 0.2 \text{ mg/ml}$, die Aufnahmen wurden in 50 mM Na_2SO_4 durchgeführt. A) Topographie ($3.1 \times 3.1 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 72 nm. B) Höhenanalyse entlang der in A) gezeigten Linie. C) Topographie ($3.1 \times 3.1 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 72 nm. D) Höhenanalyse entlang der in C) gezeigten Linie. E) Topographie ($3.1 \times 3.1 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 72 nm. F) Höhenanalyse entlang der in E) gezeigten Linie.

Rand des ursprünglichen *Giant Vesicles* in Abb. 5.31 A durch eine Linie gekennzeichnet.

Die innerhalb des dargestellten Randes des *Giant Vesicles* gebildeten Membranen ondulieren mit der Porenstruktur. In einer Höhenanalyse kann jedoch deutlich zwischen membranüberspannten und freien Poren unterschieden werden. Abb. 5.31 B zeigt eine solche Analyse entlang der in Abb. 5.31 A dargestellten Linie. Die mit 1, 2, 6 und 7 bezeichneten Poren sind nicht mit einer Membran bedeckt, die Rasterkraftspitze tritt etwa 10 nm tief in die Poren ein, während die Poren 3, 4 und 5 mit Membran überspannt sind, was daran zu erkennen ist, dass die Rasterkraftspitze nur etwa 3-5 nm tief in die membranüberspannten Poren eindringt. Dies zeigt, dass die Poren nur stellenweise mit einer Membran überspannt wurden. Eine weitere Höhenanalyse ist entlang der in Abb. 5.31 C dargestellten Linie durchgeführt worden. Neben vier geöffneten Poren, die mit (1), (2), (3), (4) und (5) gekennzeichnet wurden, sind Strukturen mit einer Höhe bis zu 40 nm zu erkennen, die die Größenordnung der Poren besitzen. Dies lässt darauf schließen, dass der *Giant Vesicle* zerborsten ist und sich neben Lipiddoppelschichten stellenweise kleine Vesikel ausgebildet haben, die an der Oberfläche adhäreren. Zum Vergleich wurde eine Höhenanalyse in einem nicht mit einer Lipidmembran überspannten Bereich außerhalb der ursprünglichen Vesikelstruktur entlang der in Abb. 5.31 E dargestellten Linie durchgeführt (Abb. 5.31 E/ F). Die Rasterkraftspitze tritt etwa 10 - 12 nm tief in die Poren ein.

Weitere rasterkraftmikroskopische Aufnahmen bestätigen, dass neben Lipiddoppelschichtstrukturen auch Multischichten vorliegen. Abb. 5.32 A/ B zeigt die Topographie und das Phasenbild ($4.1 \times 4.7 \mu\text{m}^2$) eines geordneten, porösen Aluminats nach der Inkubation mit *Giant Vesicles*. Es können deutlich zwei verschiedene Bereiche unterschieden werden, das poröse Aluminatsubstrat und eine Lipidstruktur, die die Poren überdeckt. Eine Höhenanalyse entlang der in Abb. 5.32 A dargestellten Linie ist in Abb. 5.32 C gezeigt. Der Höhenunterschied zwischen Lipidstruktur und Probenoberfläche beträgt (210 ± 20) nm und ist somit um ein Vielfaches höher als die erwartete Höhe von 4-6 nm für eine Lipiddoppelschicht. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei der beobachteten Lipidstruktur um einen an der Oberfläche adhärerten *Giant Vesicle* handelt.

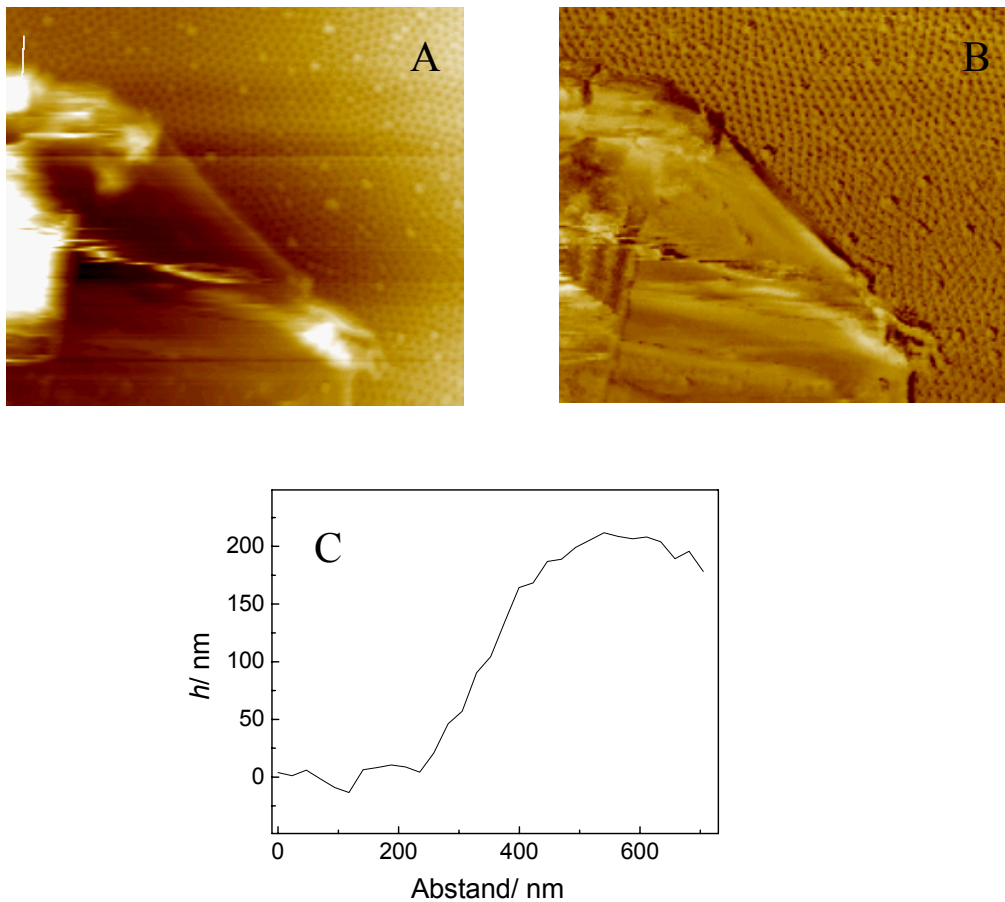


Abb. 5.32. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Intermittent-Contact-Mode*) eines geordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminats nach der Inkubation mit *Giant Vesicles* (65 w% Asolectin, 25 w% POPG, 5 w% Cholesterol, 5 w% Lyso-PC). Die Konzentration der Lipidsuspension betrug $c = 0.2$ mg/ml, die Aufnahmen wurden in 50 mM Na_2SO_4 durchgeführt. A) Topographie ($4.1 \times 4.7 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 857 nm. B) Phasenbild ($4.1 \times 4.7 \mu\text{m}^2$) mit einer Skala von 36.3° . C) Höhenanalyse entlang der in A) gezeigten Linie. Der Höhenunterschied beträgt (210 ± 20) nm.

5.2.6 Lipidmembranen auf porenüberspannenden Polyelektrolytschichten

Das Spreiten von *Giant Vesicles* auf porösen Substraten zeigt die prinzipielle Möglichkeit, Poren mit Lipidmembranen zu überspannen. Jedoch weist die erzeugte porenüberspannende Lipidschicht Defektstellen und Inhomogenitäten auf, die eventuell auf die Porösität der Oberfläche zurückzuführen sein könnten. Um eine Bildung von Lipidschichten durch eine homogene Oberfläche zu unterstützen und die entstehende porenüberspannende Membran zu stabilisieren, wurde die Strategie verfolgt, Polyelektrolytkissen zwischen der Lipidschicht und dem porösen Aluminat

aufzubringen. Aufgrund der hohen Ionenleitfähigkeit gequollener Polyelektrolytschichten [103, 104] sollte der Vorteil der beiden Kompartimente trotz eines Überspannens der Poren mit Polyelektrolyt weiterhin bestehen bleiben. Eine Möglichkeit zum Aufbau solcher Polyelektrolytschichten besteht in der alternierenden Adsorption entgegengesetzt geladener Polyelektrolyten an Oberflächen (*layer-by-layer*-Technik), die in Abb. 5.33 schematisch dargestellt ist. Auf diese Weise lassen sich Schichten kontrollierbarer Dicke im Bereich von einigen Nanometern herstellen [104].

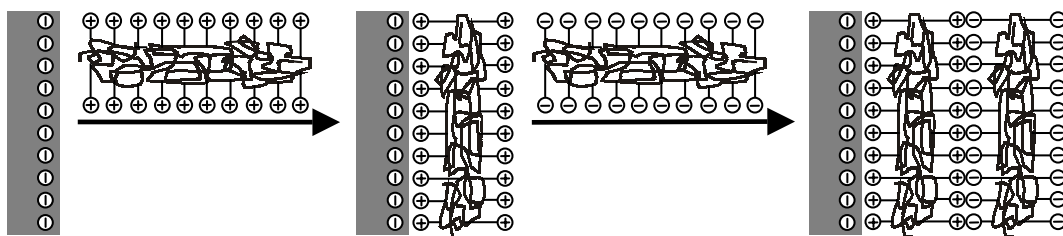


Abb. 5.33. Schematische Darstellung der *layer-by-layer*-Präparation zum Aufbau von Polyelektrolytmultischichten auf einem geladenen Substrat.

Sowohl Polyelektrolytschichten als auch polyelektrolytgestützte Lipidschichten sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Harris et al. zeigten, dass bei der Deposition von 5 Doppelschichten aus Polyallylaminhydrochlorid (PAH) und Polystyrolsulfonat (PSS) die Poren poröser Aluminate mit Porengrößen von 20 nm komplett überspannt werden, ohne jedoch die Poren mit Polyelektrolyten zu füllen [105]. Die Bedeckung der Poren mit Polyelektrolyten wurde mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen [105, 106]. Majewski, Wong und Seitz untersuchten DMPC-Schichten auf mit Polyethylenimin (PEI) beschichteten Quarzsubstraten. Es ist bekannt, dass PEI auf Glassubstraten definierte Adsorptionsschichten ausbildet [107]. Die Neutronenreflektometrie zeigte, dass eine maximale Oberflächenbelegung mit Lipidschichten von 94 % erreicht werden kann [5, 108, 109].

Die Literaturdaten zeigen sowohl die Möglichkeit auf, die Poren mit Polyelektrolyt-Multischichten zu überspannen, ohne die Poren zu füllen, als auch elektrisch dichte Lipiddoppelschichten auf einem Polyelektrolytfilm aus PEI zu präparieren. Es ist daher zu erwarten, dass eine Zusammenführung dieser Techniken grundsätzlich die Präparation einer Lipidschicht auf porenüberspannenden Polyelektrolyten ermöglicht. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde Polystyrolsulfonat (PSS) als Polyanion verwendet. Bei der Auswahl der

Polykationen wurde darauf geachtet, dass diese keine Halogenide enthalten, die das Impedanzverhalten des Aluminats verändern. Es wurde PEI als Polykation verwendet.

Polyelektrolytschichten auf planarem Gold

Zur Überprüfung der Präparation von Polyelektrolyt-Multischichten durch die *layer-by-layer*-Adsorption wurden Quarzmikrowaage-Messungen durchgeführt. Die Goldelektrode wurde zunächst mit MEA funktionalisiert. Aufgrund dieser Funktionalisierung wies die Elektrode eine positive Oberflächenladungsdichte auf.

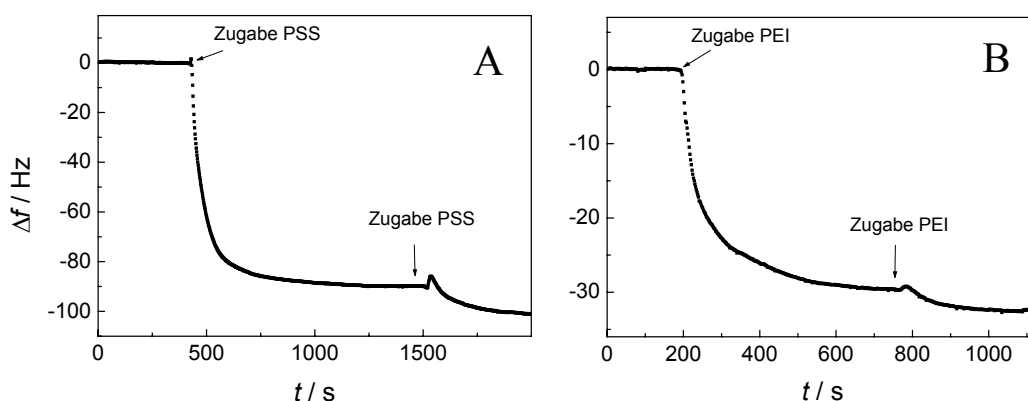


Abb. 5.34. Quarzmikrowaage-Messung der Adsorption von Polyelektrolyten auf einer mit MEA funktionalisierten Goldelektrode in 5 mM Bis-Tris/ H_2SO_4 , pH 5.6. A) Die Zugabe von 20 bzw. 34 μM PSS resultiert in einer Frequenzänderung von (90 ± 1) Hz und weiteren (10 ± 1) Hz. B) Die Zugabe von 0.7 bzw. 1.2 mM PEI resultiert in einer Frequenzänderung von (29.5 ± 0.5) Hz und weiteren (3 ± 0.5) Hz.

Abb. 5.34 A zeigt eine QCM-Messung für die Zugabe von PSS. Die erste Zugabe mit einer Konzentration von 20 μM resultierte in einer Frequenzänderung von (90 ± 1) Hz. Eine zweite Zugabe mit einer Konzentration von 34 μM rief eine Frequenzänderung hervor, die mit (10 ± 1) Hz wesentlich kleiner ist als die erste Zugabe. Dies lässt darauf schließen, dass bei der ersten Zugabe bereits eine Polyelektrolytschicht ausgebildet wurde, die eine elektrostatische Abstoßung weiterer PSS-Moleküle beinhaltet und somit eine weitere Anlagerung der Moleküle bei der zweiten Zugabe verhindert. Nach gründlichem Spülen mit Puffer wurde die Adsorption von PEI auf der mit MEA und PSS bedeckten Goldelektrode untersucht, die in Abb. 5.34 B dargestellt ist. Die PEI-Zugabe lieferte bei einer Konzentration von 0.7 mM eine Frequenzänderung von (29.5 ± 0.5) Hz bei der ersten und (3.0 ± 0.5) Hz für eine Konzentration von 1.2 mM bei der zweiten Zugabe. Die vergleichsweise geringe Frequenzänderung bei der zweiten Zugabe lässt darauf

schließen, dass bei der ersten Zugabe bereits eine PEI-Schicht ausgebildet wurde. Der Aufbau einer weiteren PSS-Schicht erzielt Frequenzänderungen von (77 ± 0.5) Hz bzw. (4 ± 0.5) Hz mit Konzentrationen von $20 \mu\text{M}$ bzw. $34 \mu\text{M}$. Die nach gründlichem Spülen erfolgte weitere Zugabe von PEI (34 ± 1) Hz und (8 ± 0.5) Hz mit Konzentrationen von 0.7 mM bzw. 1.2 mM . Die erhaltenen Frequenzänderungen sind in Abb. 5.35 dargestellt. Die Daten sind mit einem Fehler behaftet, der auf eine veränderte Ionenstärke bei Zugabe der Polyelektrolyte zurückzuführen ist. Die auftretende Ionenstärkeänderung geht mit einer Frequenzabnahme Δf einher. Eine Erhöhung der Ionenstärke des verwendeten Messpuffers könnte die relative Veränderung der Ionenstärke des Puffers bei Zugabe der Polyelektrolytlösung zwar einschränken. Im Fall einer hohen Ionenstärke des Puffers ist jedoch zu erwarten, dass die im Puffer vorhandenen Ionen die Ladung der Polyelektrolytschichten zum großen Teil abschirmen und somit die Oberflächenladung verändern, die zur Physisorption weiterer Polyelektrolytschichten führt. Dies könnte zu einer unvollständigen Ausbildung der Schichten führen. Ein Vergleich von Messungen, die in Puffern unterschiedlicher Konzentration durchgeführt wurden, ist daher nicht möglich. Der Einfluss der Ionenstärkeveränderung auf die Frequenzabnahme kann somit über die durchgeführten Messungen nicht quantifiziert werden. Trotz des auftretenden Fehlers bestätigen die Daten, dass die Polyelektrolyte an die mit MEA funktionalisierte Elektrode adsorbieren.

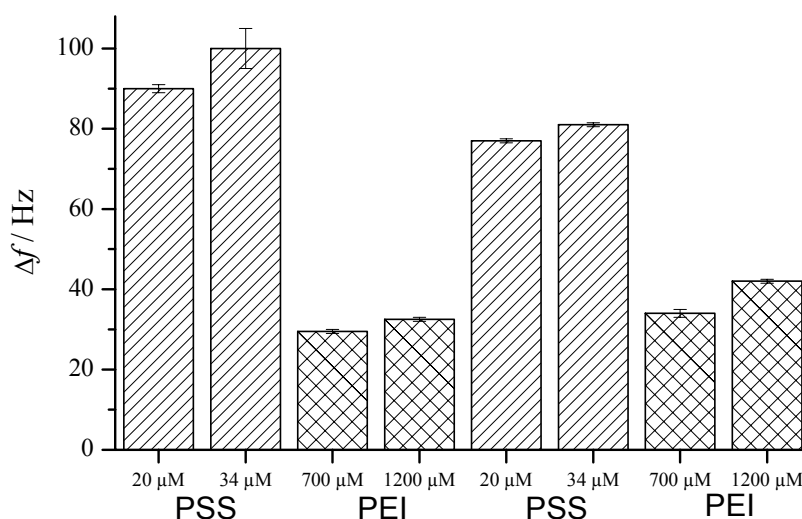


Abb. 5.35. Auftretende Frequenzänderung Δf bei Zugabe von Polyelektrolyten angegebener Konzentration c auf eine mit MEA beschichtete Quarzelektrode. Die Polyelektrolyte wurden in angegebener Reihenfolge auf den Quarz gegeben. Zwischen den Zugaben der verschiedenen Polyelektrolyte wurde die Probe mehrmals mit Reinstwasser gespült.

Polyelektrolytschichten bestehend aus je 2 Schichten PSS und PEI auf planaren mit MEA funktionalisierten Goldelektroden wurden impedanzspektroskopisch untersucht. Die Spektren der Elektrode nach Inkubation mit den Polyelektrolytlösungen wiesen nahezu keinen Unterschied im Vergleich zu dem Spektrum der mit MEA funktionalisierten Elektrode auf. Eine Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (4) liefert eine Kapazitäten C_{el+m} von $16.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die mit MEA funktionalisierte Elektrode und $13.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die Elektrode nach Inkubation mit den Polyelektrolyten.

Polyelektrolytschichten auf porösem Aluminat

Zur Überprüfung der *layer-by-layer*-Präparationen von Polyelektrolyten auf porösem Aluminat wurden rasterkraftmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Harris et al. präparierten Polyelektrolytschichten auf porösen Aluminaten. Sie fanden, dass die Poren bei der Deposition von 5 Doppelschichten PAH/ PSS komplett überspannt wurden, ohne jedoch mit Polyelektrolyten gefüllt zu sein [105]. Die Bedeckung der Poren mit Polyelektrolyten wurde mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Es wird vermutet, dass das Überspannen der Poren auf die verzweigte Struktur der Polyelektrolyte zurückzuführen ist [105, 106].

Abb. 5.36 zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines geordneten, goldbelegten, porösen Aluminats, das mit MEA funktionalisiert und auf dem über die *layer-by-layer*-Technik 6 Doppelschichten aus PSS/ PEI präpariert wurden. Dazu wurde das funktionalisierte Substrat für 15 Minuten in wässriger, 0.12 mM PSS-Lösung, pH 5.6 inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit Reinstwasser wurde das Substrat für 15 Minuten in wässriger, 4 mM PEI-Lösung, pH 5.6 inkubiert und anschließend gründlich mit Reinstwasser gespült. Dieser Prozess wurde insgesamt sechs mal wiederholt.

Abb. 5.36 lässt ein $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ großes Scanfenster erkennen, in dem vor dieser Aufnahme mit hoher Kraft gerastert wurde. Die hohe Kraft, die die Spitze auf die Oberfläche ausübt, zerstört die weiche Oberflächenstruktur, die Polyelektrolytschichten. Durch das Entfernen der Polyelektrolytschichten wird das darunterliegende poröse Aluminat sichtbar. Die glatte Struktur außerhalb des Scanfensters beweist, dass die restlichen Poren komplett mit Polyelektrolyt bedeckt sind.

Eine impedanzspektroskopische Untersuchung eines polyelektrolytbelegten Aluminats ist in Abb. 5.40 dargestellt. Es ist eine deutliche Veränderung des Spektrums nach dem Aufbringen der Polyelektrolytschichten zu erkennen.

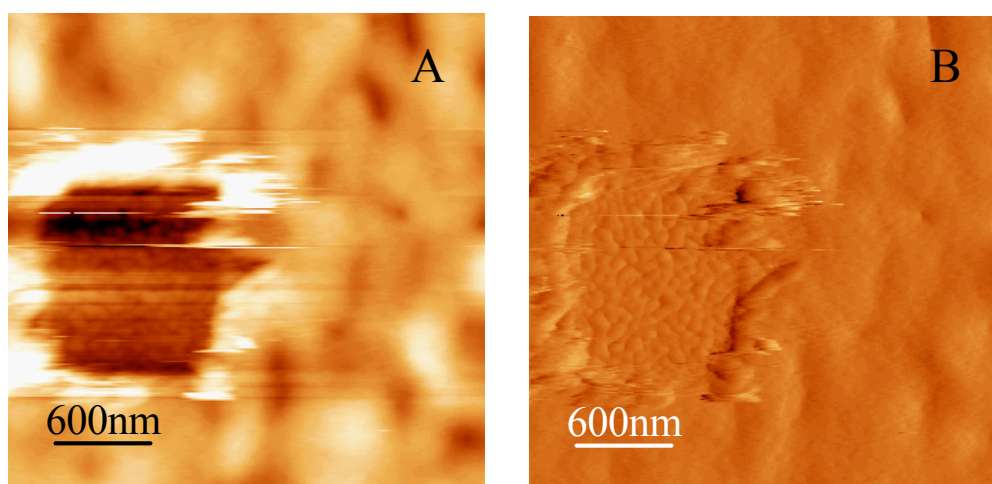


Abb. 5.36. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Contact-Mode*) eines geordneten, aufgeweiteten, porösen Aluminats mit einer MEA-Schicht und 6 Doppelschichten aus PSS/ PEI. Im Inneren des Scanfensters ist das poröse Aluminat zu erkennen, die restlichen Poren sind komplett mit Polyelektrolyt überspannt. A) Topographie ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 100 nm. B) Auslenkung ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$).

Polyelektrolytgestützte Lipidmembranen auf planaren Substraten

Die Präparation von Lipidmembranen auf den Polyelektrolyt-Multischichten wurde zunächst auf planaren Gold- und Glimmer-Substraten durchgeführt, bevor diese auf das poröse Aluminat übertragen wurden.

Abb. 5.37 zeigt eine Quarzmikrowaagemessung bei Zugabe unilamellarer Vesikel (65 % Asolectin, 25 % POPG, 5 % Cholesterol, 5 % Lyso-PC) mit einer Konzentration von 0.2 mg/ml auf eine mit MPA und PEI beschichtete Goldelektrode. Die Zugabe liefert eine Frequenzabnahme Δf von (40 ± 1) Hz. Diese Frequenzänderung liegt in dem für die Bildung einer Lipiddoppelschicht erwarteten Rahmen. Keller und Kasemo untersuchten die Adsorptionskinetik unilamellarer Vesikel auf SiO_2 und oxidierten Goldelektroden mittels Quarzmikrowaagetechnik. Die Inkubation von SiO_2 mit Vesikeln führte zur Ausbildung einer Lipiddoppelschicht mit einer Frequenzänderung von 26 Hz, während die Inkubation von Goldelektroden mit Vesikeln zu einer Frequenzänderung von 90 Hz führte und damit die Adhäsion intakter Vesikel anzeigte [110]. Die größere Frequenzänderung für den Fall, dass intakte Vesikel auf der Oberfläche vorliegen, ist durch Viskositätseffekte zu begründen. Aufgrund der Literaturdaten ist anzunehmen, dass die beobachtete Abnahme von (40 ± 1) Hz auf die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht auf der polyelektrolytbelegten Oberfläche zurückzuführen ist.

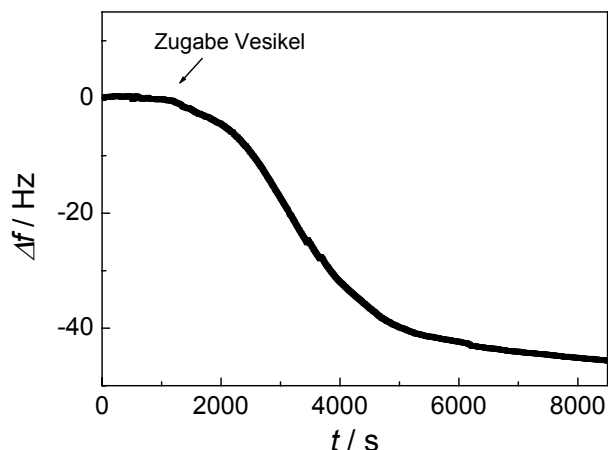


Abb. 5.37. Quarzmikrowaage-Messung auf einem mit einer MPA- und einer PEI-Schicht bedeckten Goldelektrode in 10 mM Tris/ H_2SO_4 , pH 7.0. Es wurde eine Vesikelsuspension aus 65 % Asolectin, 25 % POPG, 5 % Cholesterol und 5 % Lyso-PC mit einer Konzentration von $c = 0.2$ mg/ml zugegeben.

In einem weiteren Schritt wurden impedanzspektroskopische Untersuchungen an Goldelektroden mit je 2 Schichten PSS/ PEI durchgeführt, die mit unilamellaren DOPC/ POPG bzw. DMPC/ DMPG-Vesikeln inkubiert wurden. Die Impedanzspektren, die nach der Inkubation der Probe mit Vesikeln erhalten wurden, zeigten keine Veränderung bezüglich der Impedanzspektren des polyelektrolytbedeckten Substrats. Ein Grund für die fehlende Ausbildung einer Lipidschicht könnte in der Hydratisierung der Polyelektrolytschicht liegen, die zu einer großen Oberflächeninhomogenität führt. Wong et al. untersuchten Oberflächen, die mit einer PEI-Schicht belegt waren und mit DMPC-Vesikeln inkubiert wurden mittels Neutronenreflektometrie. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass im Fall einer gequollenen Polyelektrolytschicht komplexe Lipidstrukturen ausgebildet werden, während auf einer Polyelektrolytschicht, die für mehrere Stunden an Luft getrocknet wurde, eine Lipidmembran ausgebildet wird [108]. Die impedanzspektroskopische Untersuchung von Goldelektroden, auf denen 2 über mehrere Stunden getrocknete Polyelektrolyt-Doppelschichten aufgebracht und die mit Vesikeln inkubiert wurden, zeigten jedoch kein verändertes Impedanzspektrum nach der Inkubation mit Vesikeln. Da die Quarzmikrowaage-Messung während der Inkubation mit Vesikeln auf einer einzelnen Polyelektrolytschicht die Ausbildung einer Lipidschicht anzeigt, könnte die fehlende Ausbildung einer Lipidschicht auf die Durchwebung der Polyelektrolytschichten zurückzuführen sein, die mit einer gegenseitigen Ladungsabschirmung einhergeht. Die Oberflächenladung der Polyelektrolyt-Multischichten, die das Spreiten der Vesikel induziert, ist demnach geringer als im Fall einer einzelnen Schicht. Um dennoch die Ausbildung einer Lipidschicht zu

erzielen, wurde der Lösung zur Präparation der obersten Polyelektrolytschicht 0.5 – 2 M NaCl bzw. Na₂SO₄ zugegeben. Dies führt zur Ausbildung einer dickeren Polyelektrolytschicht im Vergleich zur Präparation ohne Salzzugabe, da die Ionen die Ladung der Polyelektrolyte abschirmen. Weitere Polyelektrolyte können sich aus diesem Grund besser an eine bereits bestehende Schicht anlagern, da die gegenseitige Abstoßung gleicher Polyelektrolyte vermindert wird. Impedanzspektroskopische Untersuchungen von Goldelektroden, die mit 2 über mehrere Stunden getrockneten Polyelektrolyt-Doppelschichten belegt waren und deren oberste Polyelektrolytschicht unter Zugabe von 0.5 - 2 M Na₂SO₄ präpariert wurde, zeigten ein verändertes Impedanzspektrum nach der Inkubation mit Vesikeln. Dies lässt darauf schließen, dass das Spreiten der Vesikel stark vom Hydratisierungsgrad der Polyelektrolyte sowie von der Dicke der letzten Polyelektrolytschicht abhängt.

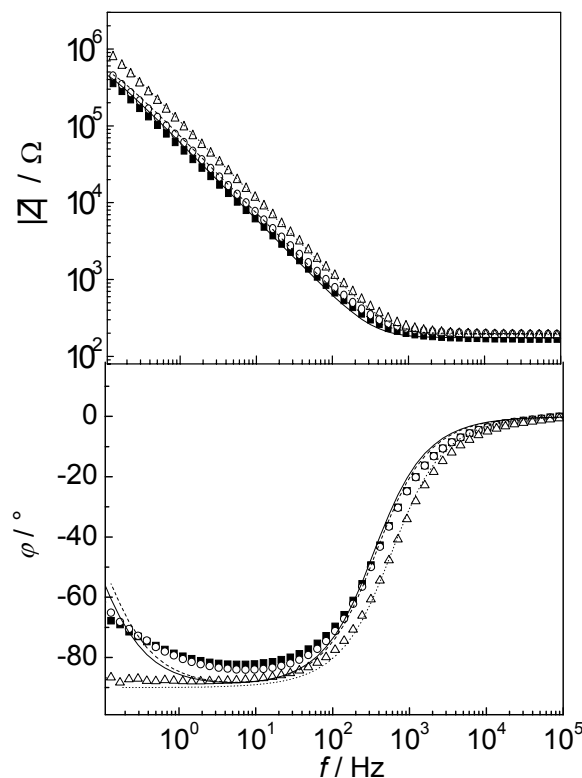


Abb. 5.38. Impedanzspektren einer mit MEA funktionalisierten Goldelektrode vor (■) und nach der je 2maligen Inkubation mit PSS/ PEI (○) sowie nach Inkubation mit unilamellaren DMPC/ DMPG (7:3)-Vesikeln (Δ). Der Lösung zur Präparation der letzten PEI-Schicht wurde 2 M Na₂SO₄ zugegeben. Vor der Vesikelinkubation wurde das Substrat über Nacht an Luft getrocknet. Die durchgezogenen Linien resultieren aus der Anpassung der Parameter entsprechender Ersatzschaltkreise an die Daten. Die Auswertung von (■) und (○) erfolgte mit dem Ersatzschaltkreis (5) und lieferte folgende Ergebnisse: $C_m = 20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (–) bzw. $17 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (---), $R_m = 10^6 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Die Auswertung von (Δ) mit dem Ersatzschaltbild (4) ergab eine Kapazität von $C_{\text{el+m}} = 10.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (.....).

Abb. 5.38 zeigt beispielhaft das Impedanzspektrum einer mit MEA funktionalisierten Goldelektrode vor und nach der je zweimaligen Inkubation mit PSS bzw. PEI sowie nach der Inkubation mit unilamellaren DMPC/ DMPG-Vesikeln (7:3). Der Lösung zur Präparation der letzten PEI-Schicht wurde 2 M Na₂SO₄ zugegeben. Eine Anpassung des Ersatzschaltkreises (4) an die Daten liefert für die mit MEA funktionalisierte Goldelektrode nach Inkubation mit den Polyelektrolytlösungen Kapazitäten von 17 – 20 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ eine Kapazität von 10.7 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die Goldelektrode nach der Inkubation mit den Vesikeln. Es wurden verschiedene Lipidmischungen untersucht: Zum einen wurde der Anteil an negativ geladenem Lipid variiert, zum anderen wurden ungesättigte Lipide verwendet, die bei Raumtemperatur in der fluiden Phase vorliegen. Die erhaltenen Kapazitäten sind in Tab. 5.2 angegeben. In keinem der untersuchten Fälle konnte impedanzspektroskopisch die Ausbildung einer Lipidschicht beobachtet werden.

Tab. 5.2. Kapazitäten, die durch Inkubation polyelektrolytbedeckter Goldelektroden mit Vesikeln verschiedener Lipidzusammensetzung erhalten wurden. Der Lösung zur Präparation der obersten Polyelektrolytschicht wurde 2 M Na₂SO₄ zugesetzt. Die Auswertung erfolgte durch Anpassung des Ersatzschaltkreises (4) an die Daten: $C_{\text{el+m}}$ (1) entspricht der Kapazität einer mit MEA funktionalisierten Goldelektrode, $C_{\text{el+m}}$ (2) der Kapazität der Elektrode nach Aufbringen von 2 Polyelektrolyt-Doppelschichten und $C_{\text{el+m}}$ (3) nach Inkubation mit Vesikeln angegebener Zusammensetzung.

Lipidmischung	$C_{\text{el+m}}$ (1) [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	$C_{\text{el+m}}$ (2) [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	$C_{\text{el+m}}$ (2) [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]
DMPC/DMPG 9:1	16.9 ± 0.5	13.8 ± 0.5	12.3 ± 0.5
DMPC/DMPG 8:2	17.3 ± 0.5	17.7 ± 0.5	11.5 ± 0.5
	20.0 ± 0.5	16.2 ± 0.5	13.1 ± 0.5
DMPC/DMPG 7:3	19.1 ± 0.5	15.7 ± 0.5	10.6 ± 0.5
DOPC/DOPG 8:2	18.2 ± 0.5	15.5 ± 0.5	10.4 ± 0.5

Impedanzspektroskopische Untersuchungen polyelektrolytbedeckter planarer Goldsubstrate, die mit Vesikeln inkubiert wurden, lassen nicht auf die Ausbildung einer Lipidschicht schließen. Zur Untersuchung der Oberflächenstruktur wurden daher rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an planaren Proben durchgeführt.

Abb. 5.39 A zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines polyelektrolytbedeckten Glimmersubstrates, das mit unilamellaren DMPC/ DMPG (4:1) -Vesikeln inkubiert wurde. Der Lösung zur Präparation der letzten PEI-Schicht wurde 2 M NaCl zugegeben. Die topographische Abbildung lässt deutlich Bereiche

unterschiedlicher Höhe erkennen. Die in Abb. 5.39 B dargestellte Höhenanalyse, die entlang der in Abb. 5.39 A gezeigten Linie durchgeführt wurde, lässt drei verschiedene Höhen erkennen. Die Höhenunterschiede betragen (11 ± 1) nm und (5 ± 1) nm bezüglich des jeweils tieferen Bereichs. Es ist anzunehmen, dass der unterste Bereich den Polyelektrolytschichten entspricht, während die beiden höheren Bereiche eine Lipidstruktur darstellen. Die Polyelektrolytschicht ist demnach nur stellenweise mit Lipid bedeckt. Eine Lipiddoppelschicht besitzt je nach Zusammensetzung eine Höhe von 4-6 nm [111], während die in Abb. 5.39 A abgebildete Lipidstruktur mit (11 ± 1) nm bzw. weiteren (5 ± 1) nm die doppelte bzw. dreifache Höhe besitzt. Es kann daher angenommen werden, dass die Lipide im Wesentlichen als Multischichten auf der Probe vorliegen.

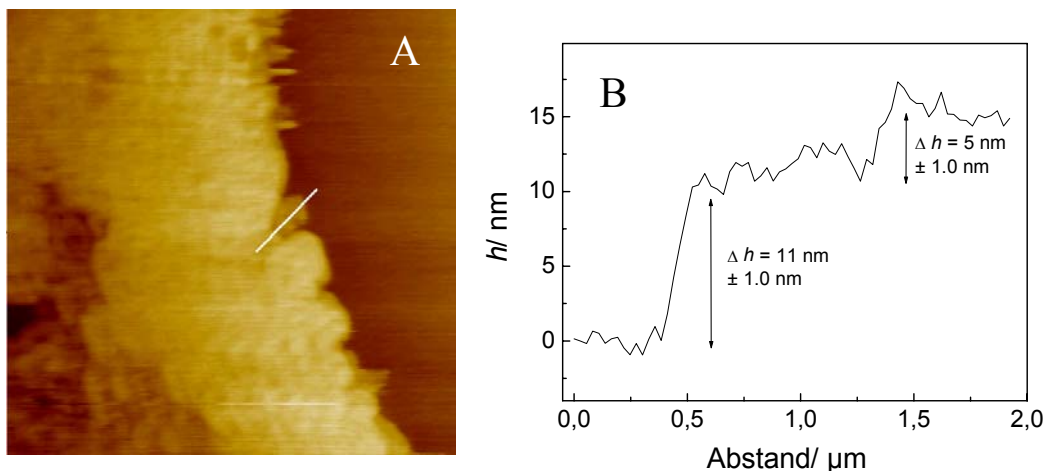


Abb. 5.39. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Contact-Mode*) eines mit zwei PEI-Schichten und einer PSS-Schicht bedeckten Glimmer-Substrats, das für 30 Minuten mit unilamellaren DMPC/ DMPG-Vesikeln 4:1 inkubiert wurde. A) Topographie ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 45 nm. B) Höhenanalyse entlang der in A) gezeigten Linie. Die Höhendifferenzen der Stufen betragen (11 ± 1) nm und (5 ± 1) nm.

Polyelektrolytgestützte Lipidmembranen auf porösem Aluminat

Die auf den planaren Substraten eingesetzten Präparationsmethoden wurden auf das poröse Aluminat übertragen und die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht auf den polyelektrolytbedeckten Aluminaten impedanzspektroskopisch untersucht. Abb. 5.40 zeigt die Spektren eines ungeordneten, porösen Aluminats, das mit 25 nm Gold belegt und mit MEA funktionalisiert wurde, vor und nach der Inkubation mit Polyelektrolyten sowie mit unilamellaren Vesikeln aus DMPC/ DMPG (4:1). Das Impedanzspektrum nach der Inkubation mit Polyelektrolytlösung, die sowohl für PEI

als auch für PSS jeweils 6 mal erfolgte, ist zu größeren Frequenzen verschoben. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die 6 Polyelektrolyt-Doppelschichten im Vergleich zu den 2 Doppelschichten, die auf Goldelektroden untersucht wurden, einen kapazitiven Beitrag liefern.

Das Spektrum nach Inkubation des funktionalisierten und polyelektrolytbedeckten Substrates mit unilamellaren Vesikeln unterscheidet sich dagegen kaum von dem Spektrum vor der Vesikelinkubation.

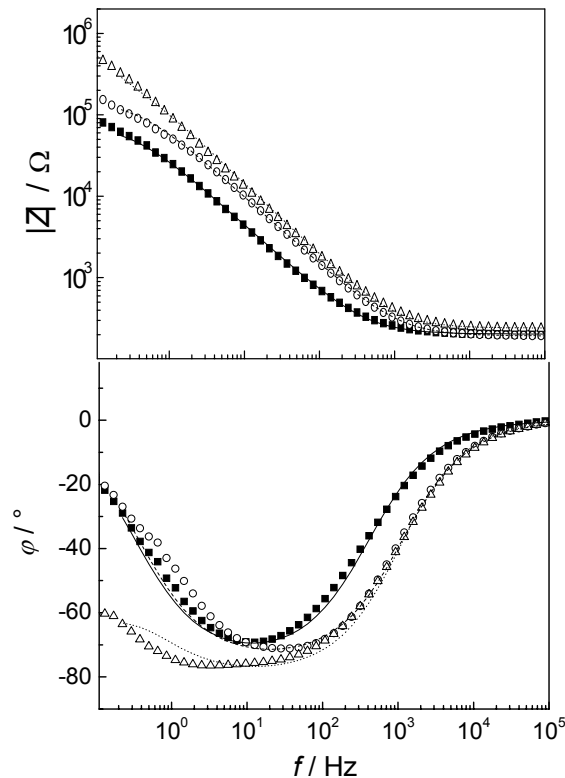


Abb. 5.40. Impedanzspektren von ungeordnetem, ausgedünntem, porösem Aluminat, das mit 25 nm Gold belegt und mit MEA funktionalisiert wurde, vor (■) und nach der jeweils 6-maligen Inkubation mit PSS/ PEI (○) sowie nach der Inkubation mit unilamellaren Vesikeln aus DMPC/ DMPG (4:1) (Δ). Die durchgezogenen Linien resultieren aus der Anpassung der Daten. Die Auswertung von (■) und (○) erfolgte über Ersatzschaltkreis (2) und lieferte folgende Ergebnisse: (■) $A = 23 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.83$, $R = 23.7 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$, (○) $A_b = 10.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.84$, $R_b = 46 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Die Auswertung von (Δ) erfolgte mit Ersatzschaltbild (6): $C_m = 11.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_m = 450 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

5.2.7 Chemisorbierte Lipidmembranen

Die bisherigen Präparationsansätze einer Lipidschicht über Vesikelfusion beruhen auf elektrostatischer Anziehung zwischen Vesikeln und einem elektrisch geladenen Substrat. Es konnte die prinzipielle Möglichkeit gezeigt werden, porenüberspannende Membranen herzustellen, jedoch wurde keine vollständige Belegung erzielt. In einem anderen Ansatz wurden daher Vesikel verwendet, die an Gold chemisorbieren und von denen bekannt ist, dass sie defektarme planare Lipiddoppelschichten ausbilden. Die Vesikel setzten sich zusammen aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphothioethanol (DPPTE) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC).

Impedanzspektroskopische Untersuchungen DPPTE-haltiger Lipide auf Goldelektroden

Um die Lipidzusammensetzung zu finden, bei der die durch Vesikelspreiten und Fusion entstehenden planaren Lipiddoppelschichten wenig Defektstellen aufweisen, wurden zunächst Vesikel unterschiedlicher Zusammensetzung bestehend aus DPPTE/ DOPC auf planaren Goldelektroden inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 50 °C. Eine Untersuchung der Oberflächen erfolgte mittels Impedanzspektroskopie.

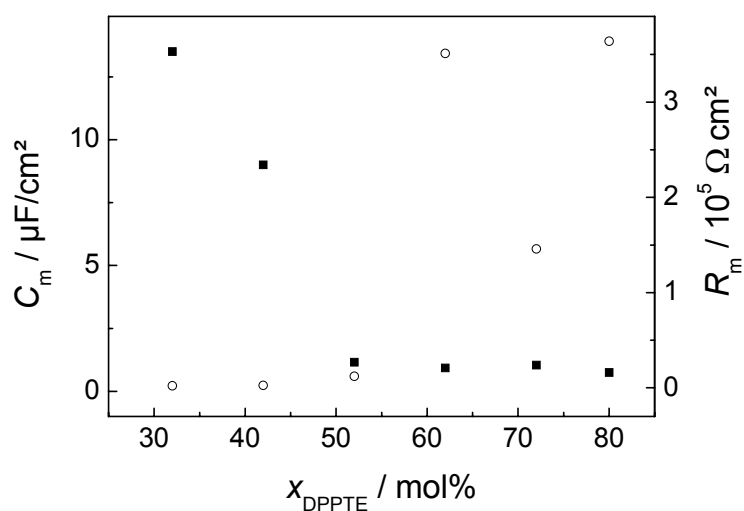


Abb. 5.41. Abhängigkeit der spezifischen Kapazität C_m (■) und des spezifischen Widerstandes R_m (○) einer Lipidschicht aus DOPC/ DPPTE vom Molenbruch x_{DPPTE} . Die Inkubation erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 50 °C. Alle Messungen wurden auf planaren Goldelektroden in 10 mM Bis-Tris, pH 5.5 durchgeführt und mittels des Ersatzschaltbildes (3) ausgewertet.

Die durch eine Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (3) (Abb. 5.23) ermittelten Kapazitäten C_m und Widerstände R_m sind in Abb. 5.41 in Abhängigkeit vom Molenbruch x_{DPPTE} dargestellt. Übersteigt der DPPTE-Gehalt 52 mol%, werden Kapazitäten von $(1.0 \pm 0.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ erhalten, die auf die Bildung einer defektarmen festkörpergestützten Lipiddoppelschicht schließen lassen. Liegt der DPPTE-Anteil unter 52 mol%, liegen die ermittelten Kapazitäten bei Werten größer $7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, es bildet sich keine isolierende Doppelschicht aus. Die Widerstände steigen ab einem Anteil von 62 mol% von Werten unter $12 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ auf Werte größer $100 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Impedanzspektroskopische Untersuchungen DPPTE-haltiger Lipide auf ungeordneten porösen Aluminaten

Die so optimierte Präparation wurde auf poröses Aluminat übertragen. Nicht geordnete poröse Aluminatsubstrate wurden mit einer dünnen Goldschicht belegt, die eine selektive Funktionalisierung der oberen Oberfläche ermöglichte.

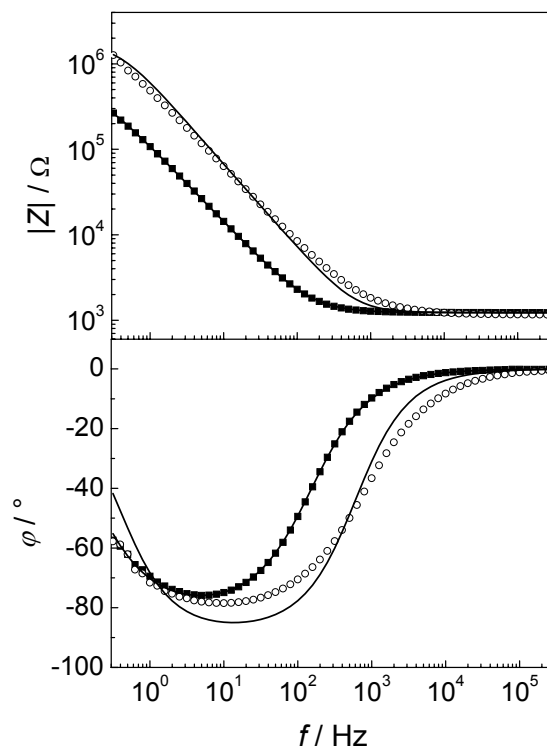


Abb. 5.42. Impedanzspektren von ungeordnetem, goldbedecktem, porösem Aluminat vor (■) und nach (○) Inkubation mit unilamellaren DPPTE/ DOPC-Vesikeln (400 nm nominelle Größe) über Nacht bei 50 °C. (■) Ersatzschaltkreis (2) wurde zur Auswertung der Impedanzspektren verwendet mit den folgenden Ergebnissen: $A_b = 5.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.89$, $R_b = 207 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. (○) Die Auswertung mit Ersatzschaltkreis (6) führte zu einer Membrankapazität von $C_m = 0.99 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einem Widerstand von $R_m = 390 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Die Aluminatsubstrate wurden mit einer Vesikelsuspension inkubiert, die 72 mol% DPPTE enthielt. Um Vesikel von den Poren auszuschließen, betrug die nominelle Größe der Vesikel 400 nm. Die Vesikelgröße überschreitet die Porengröße somit um einen Faktor von 11 und verhindert eine Diffusion der Vesikel in die Poren. Zudem ist innerhalb der Poren kein Gold, an das die Thiolgruppen chemisorbieren können. Der Inkubationsprozess resultierte in einer signifikanten Veränderung des Impedanzspektrums in Bezug auf die Spektren des porösen Aluminats, die vor dem Inkubationsprozess aufgenommen wurden (Abb. 5.42). Ein Anpassen der Parameter von Ersatzschaltbild (6) an die erhaltenen Daten unter Konstanthaltung der für das poröse Aluminat ermittelten Parameter liefert eine mäßige Übereinstimmung. Jedoch stimmt in diesem Fall die erhaltene Kapazität von $0.99 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ mit der für eine defektarme festkörperunterstützte Membran aus DPPTE/ DOPC auf Gold von $(1.0 \pm 0.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ überein.

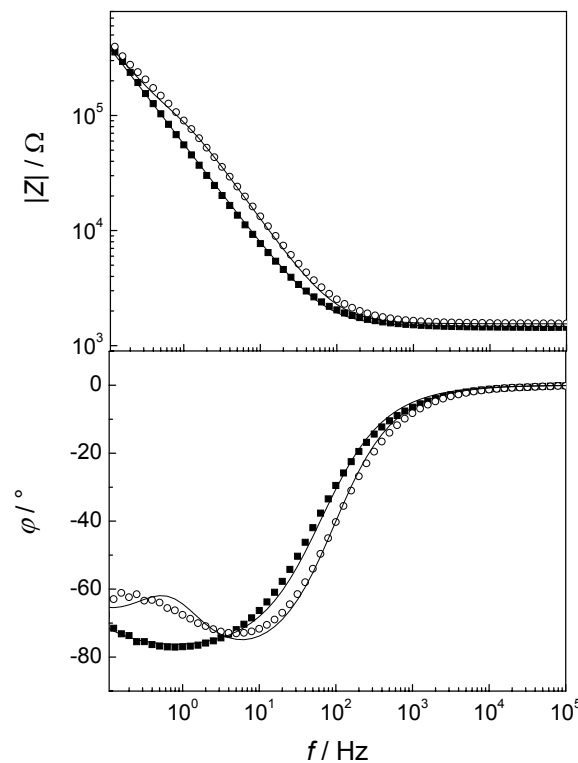


Abb. 5.43. Impedanzspektren von nichtgeordnetem, goldbelegtem, porösem Aluminat vor (■) und nach (○) Inkubation mit unilamellaren DOPC-Vesikeln (400 nm nominelle Größe) über Nacht bei 50 °C. (■) Ersatzschaltkreis (2) wurde zur Auswertung der Impedanzspektren verwendet mit den folgenden Ergebnissen: $A_b = 17.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.87$, $R_b = 620 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. (○) Die Auswertung mit Ersatzschaltkreis (6) führte zu einer Membrankapazität von $C_m = 16.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einem Widerstand von $R_m = 10 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Um sicherzustellen, dass der erhaltene Kapazitätswert auf die Bildung einer isolierenden Lipiddoppelschicht auf dem porösen Aluminatsubstrat zurückzuführen ist, wurden in einem Kontrollversuch Impedanzspektren von porösen Substraten aufgenommen, die in Puffer und in DOPC-Vesikelsuspensionen bei einer Temperatur von 50°C über Nacht inkubiert wurden. Nach der Inkubation mit Puffer bzw. DOPC-Vesikelsuspensionen zeigten sich wie in Abb. 5.43 für DOPC-Vesikelsuspensionen dargestellt nur kleine Veränderungen der Spektren. Die Anpassung der Parameter des Ersatzschaltkreises (6) aus Abb. 5.24 lieferte eine Kapazität C_m von 16.5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die erhaltenen Veränderungen im Impedanzspektrum bei Inkubation mit DPPTTE-haltigen Vesikeln auf die Bildung einer Lipiddoppelschicht auf der porösen Matrix zurückzuführen sind.

Impedanzspektroskopische Untersuchungen DPPTTE-haltiger Lipide auf geordneten porösen Aluminaten

Die oben beschriebenen Experimente zeigen deutlich die Möglichkeit, elektrisch dichte Lipiddoppelschichten auf porösem Aluminat zu präparieren. Um eine größere Porösität und eine weniger raue Oberfläche zu erhalten, wurden im weiteren geordnete Poren anstelle der nicht geordneten Poren verwendet. Die Porösität des geordneten porösen Materials beträgt $(36 \pm 7) \%$ im Gegensatz zu dem nicht geordneten porösen Material, welches nur eine Porösität von $(17 \pm 3) \%$ aufweist. Ein Impedanzspektrum eines geordneten, ausgedünnten, porösen Aluminatsubstrats ist in Abb. 5.44 gezeigt. Die Parameter des Ersatzschaltbildes (2) in Abb. 5.20 wurden an die Daten angepasst, die erhaltenen A_b -Werte sind mit 7.7 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ geringfügig größer als die für nicht geordnete Poren nach dem Ausdünnprozess. Der Wert von α ist mit 0.86 kleiner als der von nicht geordneten Poren. Es wurden unilamellare Vesikel bestehend aus DPPTTE/ DOPC (72:28) auf dem goldbedeckten porösen Aluminat inkubiert und impedanzspektroskopisch untersucht. Selbst ohne Datenauswertung ist ersichtlich, dass die Inkubation des porösen Aluminats mit der Vesikelsuspension in einer deutlichen Veränderung des Impedanzspektrums bezüglich dem, welches vor dem Inkubationsprozess aufgenommen wurde, resultiert. Kontrollexperimente von porösen Substraten, die bei 50 °C in Pufferlösung bzw. in DOPC-Vesikelsuspensionen inkubiert wurden, führten wiederum nur zu kleinen Veränderungen im Impedanzspektrum. Die Veränderung im Impedanzspektrum bei Inkubation mit DPPTTE-haltigen Vesikeln zu größeren Frequenzen zeigt somit deutlich die Bildung einer elektrisch dichten Doppelschicht. Die Anpassung von Ersatzschaltbild (6) in Abb. 5.24 an die Daten führt zu einer Kapazität C_m von 0.9 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und Membranwiderständen R_m größer 10 $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$. Die Übereinstimmung

zwischen Anpassung und Daten ist auch hier nicht perfekt. Zur Überprüfung der Langzeitstabilität wurden Impedanzspektren über eine Zeitspanne von mehr als 30 Stunden aufgenommen, ohne eine Veränderung aufzuweisen.

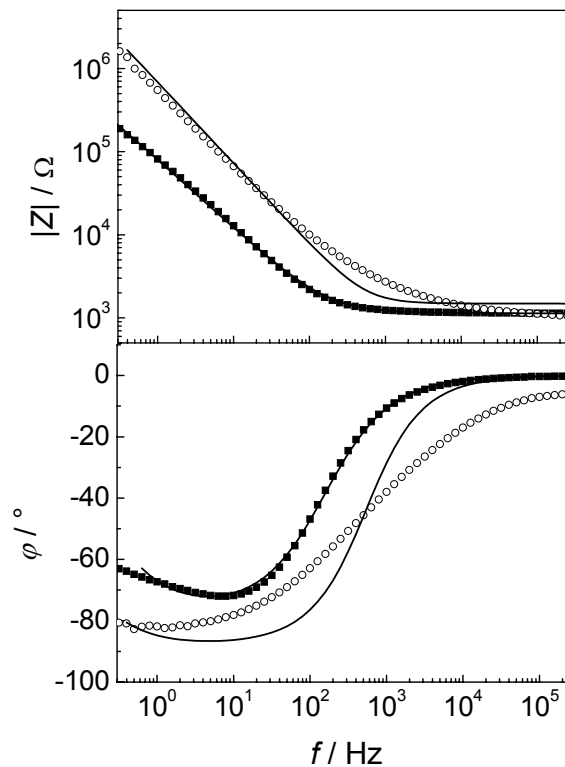


Abb. 5.44. A/B: Impedanzspektren von geordnetem, goldbedecktem, porösem Aluminat vor (■) und nach (○) Inkubation mit unilamellaren DPPTE/ DOPC-Vesikeln (400 nm nominelle Größe) über Nacht bei 50 °C. (■) Ersatzschaltkreis (2) wurde zur Auswertung der Impedanzspektren verwendet mit den folgenden Ergebnissen: $A_b = 7.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $\alpha = 0.86$, $R_b = 146 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. (○) Die Auswertung mit Ersatzschaltkreis (6) führte zu einer Membrankapazität $C_m = 0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einem Widerstand von $R_m > 10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$.

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen DPPTE-haltiger Lipide auf geordneten porösen Aluminaten

Die elektrischen Eigenschaften sowohl ungeordneter als auch geordneter poröser Aluminate nach der Inkubation mit DPPTE-haltigen Vesikel zeigen deutlich die Bildung einer elektrisch dichten Lipiddoppelschicht. Um diese Ergebnisse zu verifizieren und nachzuweisen, dass neben den gebildeten Doppelschichten keine Multischichten auf den Proben ausgebildet werden, wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Abb. 5.45 zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines geordneten porösen Aluminatsubstrats,

das mit 25 nm Gold belegt und über Nacht mit DPPTE/ DOPC-Vesikeln inkubiert wurde, die 72 mol% DPPTE enthielten.

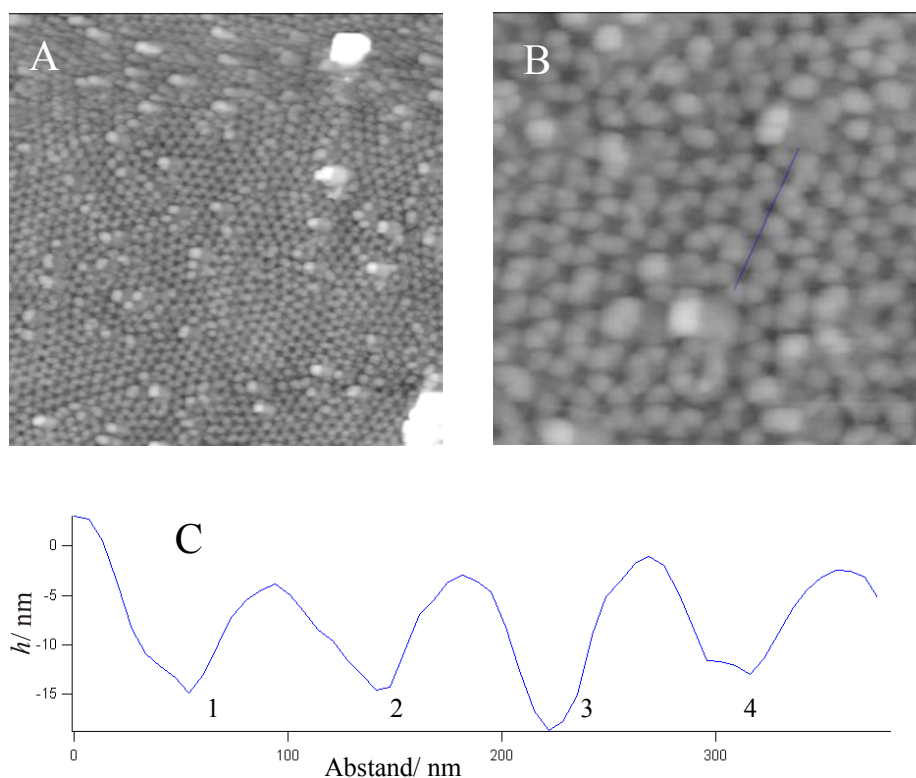


Abb. 5.45. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Intermittent-Contact-Mode*) eines geordneten, porösen, aufgeweiteten Aluminatsubstrats, das über Nacht mit DPPTE/DOPC-Vesikeln (72 mol% DPPTE) inkubiert wurde. Die Konzentration der verwendeten Vesikellösung betrug $c = 0.1$ mg/ml. A) Topographie ($3.5 \times 3.5 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 80 nm. B) Ausschnittsvergrößerung von Aufnahme A ($1.0 \times 1.2 \mu\text{m}^2$) mit einer Höhenskala von 80 nm. C) Höhenanalyse entlang der in Abb. B dargestellten Linie.

Abb. 5.45 A und die Ausschnittsvergrößerung B lassen die Poren des porösen Substrates erkennen. Ein Großteil der Poren wirkt jedoch sehr verschwommen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sie von einer Membran überspannt werden, die mit den Poren onduliert. Aufgrund der Kraft, die die Spitze auf die Membran ausübt, wird die Membran in die Poren gedrückt. Die in Abb. 5.45 C dargestellte Höhenanalyse entlang der in Abb. B gezeigten Linie lässt jedoch deutlich zwischen geöffneten und mit Lipidschicht überspannten Poren unterscheiden. Im Fall einer überspannten Pore dringt die Spitze nicht so tief in die Poren wie bei einer geöffneten Pore. Die Höhenanalyse ergibt, dass die Spitze etwa 20 nm tief in die dritte Pore eindringt, während sie in die 3 weiteren Poren nur 14 nm tief eindringt.

Eine Vergleichsmessung an einem nicht mit Vesikeln inkubiertem porösem Aluminat ist in Abb. 5.5 dargestellt. Die Spitze dringt in alle Poren gleich tief ein. Ein quantitativer Vergleich der Eindringtiefen ist in diesem Fall jedoch nicht möglich, da diese stark von der Geometrie der verwendeten Spitze abhängen. Die unterschiedlichen Eindringtiefen der Spitze in die Poren in der in Abb. 5.45 C dargestellten Höhenanalyse lässt somit darauf schließen, dass drei der in Abb. 5.45 C untersuchten Poren mit einer Lipiddoppelschicht überspannt sind, während die vierte Pore geöffnet ist.

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung der porösen Aluminate

Eine Voraussetzung zur sensitiven Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von porenüberspannenden Lipidmembranen auf porösen Aluminaten besteht in der Charakterisierung des porösen Materials an sich sowie der Modifizierung seiner elektrischen Eigenschaften. Die Untersuchung der porösen Aluminatsubstrate erfolgte mittels Rasterkraftmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie, Interferometrie und elektrischer Impedanzspektroskopie.

6.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Oberflächenporosität der ausgedünnten, porösen Aluminate wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Bruchkante porösen Aluminats zeigt annähernd zylinderförmige Poren. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Jessensky erhaltenen überein, der Untersuchungen an der Bruchkante eines porösen Aluminatsubstrats, dessen Poren mit Eisen gefüllt waren, mittels Rasterelektronenmikroskopie durchführte und die zylindrische Form der Poren nachweisen konnte [86]. Aus diesem Grund kann die mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen ermittelte Oberflächenporosität, die für die porenüberspannenden Lipidmembranen die wesentlichere Größe darstellt, in erster Näherung mit der Porosität des Substrates gleichgesetzt werden.

Aufnahmen von Proben, die über eine einfache Anodisierung hergestellt wurden, zeigten eine ungeordnete, jedoch über die gesamte Oberfläche homogen verteilte Anordnung der Poren. Die erzielten Porositäten dieser Proben lagen für die in der Impedanzspektroskopie verwendeten ausgedünnten Träger bei $(17 \pm 3) \%$. Die Ergebnisse für die Porosität stimmen mit dem von Hennesthal und Steinem an chemisch aufgeweiteten Proben erhaltenen Ergebnis von $(16 \pm 2) \%$ überein. Die dort ermittelten Porendurchmesser liegen jedoch mit $(60 \pm 10) \text{ nm}$ deutlich über dem

Wert von (22 ± 6) nm, der in der vorliegenden Arbeit für ausgedünnte Proben erhalten wurde [50]. Proben, die über einen zweistufigen Anodisierungsprozess hergestellt wurden, zeigen eine hexagonale Anordnung der Poren. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Gösele und Mitarbeitern überein [82-85]. Es wird vermutet, dass repulsive Kräfte zwischen benachbarten Poren, die aufgrund von mechanischem Stress an der Metall/Oxid-Grenzfläche auftreten, für die hexagonale Anordnung verantwortlich sind [83]. Der ermittelte Porenabstand betrug (110 ± 15) nm. Dieses Ergebnis wird durch Veröffentlichungen von Li et al. bestätigt. Sie führten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an porösen Aluminaten durch, die nach einem zweifachen Anodisierungsprozess in Oxalsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure erhalten wurden. Für Aluminate, die bei 40 V in 0.5 M Oxalsäure anodisiert wurden, erhielten sie Porenabstände von 100 nm [83, 84]. Nielsch et al. kamen zu dem Ergebnis, dass der Porenabstand von der Anodisierungsspannung abhängt, der ermittelte Wert beträgt 2.6 nm/V [82]. Für eine Anodisierungsspannung von 40 V erhält man so einen Porenabstand von 104 nm, was sowohl mit den Ergebnissen von Li et al. als auch mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten übereinstimmt.

Im Fall geordneter, ausgedünnter Proben wurde eine Porösität von (36 ± 7) % und ein Porendurchmesser von (31 ± 9) nm erhalten. Es existieren einige Veröffentlichungen zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung poröser Aluminate, jedoch war in den untersuchten Zusammenhängen weder die Porengröße noch die Porösität von Interesse, so dass ein Vergleich nicht möglich ist [82-84, 112]. Sowohl die Porösität als auch die Porendurchmesser geordneter Proben sind deutlich größer als die ungeordneter Proben, die Porenstege sind entsprechend schmaler. Dies ist darauf zurückzuführen, dass aufgrund der hexagonalen Anordnung eine höhere Packungsdichte der Poren vorliegt. Der große Porösitätsunterschied zwischen geordneten und ungeordneten Substraten erlaubt eine Untersuchung der Lipidmembranen in Abhängigkeit von der zu überspannenden Porenfläche.

6.1.2 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen der porösen Aluminaträger erlauben eine Abbildung der chemisch aufgeweiteten Poren und ermöglichen somit eine Überprüfung des Anodisierungsprozesses. Aufnahmen von Proben, die über eine einfache Anodisierung hergestellt wurden, zeigten eine ungeordnete, aber homogene Anordnung der Poren. Die Poren der chemisch aufgeweiteten, ungeordneten Substrate wiesen eine Größe von (20 ± 6) nm auf und zeigen nur einen geringfügigen

Unterschied zur Porengröße der ausgedünnten Aluminate. Hennesthal und Steinem ermittelten für analog hergestellte Proben einen wesentlich größeren Porendurchmesser von (50 ± 10) nm [50].

Proben, die über einen zweistufigen Anodisierungsprozess hergestellt wurden, zeigten eine hexagonale Anordnung der Poren über den gesamten Probenbereich. Li et al. untersuchten geordnete, poröse Aluminate mittels Rasterkraftmikroskopie, ermittelten jedoch keine Porösität [83]. Eine Höhenanalyse zeigt, dass die Poren in regelmäßigen Abständen angeordnet sind und die Rasterkraftspitze jeweils gleich weit in die Poren eindringt, was sie in der Höhenanalyse gleich tief erscheinen lässt. Die Eindringtiefe der Spitze in die Poren ist stark von der Art der verwendeten Spitze abhängig und für unterschiedliche Messungen nur für den Fall vergleichbar, dass die gleichen Cantilever verwendet wurden.

Ein weiterer Nachweis der hexagonalen Anordnung wurde über die Ermittlung des Winkels zwischen benachbarten Poren erbracht, der mit $(59 \pm 5)^\circ$ dem für eine hexagonale Anordnung auftretenden Winkel entspricht. Die Poren wiesen einen Durchmesser von (35 ± 8) nm auf und sind damit geringfügig größer als die der ausgedünnten Proben, die rasterelektronenmikroskopisch untersucht wurden.

Eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme über einen Bereich von $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$ zeigt, dass die Größe der geordneten Bereiche bis zu $(1.5 \times 1.5) \mu\text{m}^2$ beträgt. Jessensky untersuchte Aluminate, die in Schwefeläure, Phosphorsäure oder Oxalsäure anodisiert wurden und kam zu dem Ergebnis, dass die geordneten Bereiche der in Oxalsäure bei einer Spannung von 40 V anodisierten Aluminate am größten sind [86]. Li et al. erhielten die größten periodischen Anordnungen dagegen für Aluminate, die bei einer Spannung von 160 V in 10 w% Phosphorsäure anodisiert wurden [84].

6.1.3 Interferometrische Untersuchungen

Die interferometrischen Messungen beinhalteten zunächst die Untersuchung ungeordneter, aufgeweiteter, poröser Aluminate, welche mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Brechungsindizes $n_{\text{Füllung}}$ überschichtet wurden. Die Lösungsmittel dringen in die Poren und rufen somit eine Änderung des effektiven Brechungsindex n_{eff} hervor. Unter der Annahme einer zylindrischen Porenform lassen sich nach Bruggeman sowohl die Porösität als auch die Dicke der porösen Schicht ermitteln. Eine ähnliche Untersuchung wurde von Janshoff et al. durchgeführt. Sie untersuchten mit verschiedenen Lösungsmitteln überschichtetes

poröses Silizium und ermittelten sowohl die Porösität als auch die Dicke der porösen Schicht [80].

Für die Dicke d der porösen Schicht ergab sich im Fall einer für 3 Stunden anodisierten Probe ein Wert von $(6.2 \pm 0.03) \mu\text{m}$. Dies ergibt eine Porenwachstumsrate von $2.1 \mu\text{m/h}$, die mit der von Gösele und Mitarbeitern ermittelten von etwa $2.0 \mu\text{m/h}$ übereinstimmt [82-85]. Für die Porösität p wurde ein Wert von $(29 \pm 2) \%$ ermittelt. Die erhaltene Porösität ist größer als die Oberflächenporösität ungeordneter Poren von $(17 \pm 3) \%$, die mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen erhalten und unter Annahme von zylindrischen Poren in erster Näherung mit der Porösität gleichgesetzt wurde. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das Porenwachstum nicht vorstrukturierter Oberflächen ungeordnet beginnt (s. Kap. 4.2.1). Im Laufe des Anodisierungsprozesses geht das anfänglich ungeordnete Porenwachstum in ein geordnetes über. Dabei verendet das Wachstum einiger Poren, während andere eine Verbreiterung erfahren. Dies ist in Abb. 6.1 B verdeutlicht und führt zu der beobachteten Abweichung der Porösität von der Oberflächenporösität.

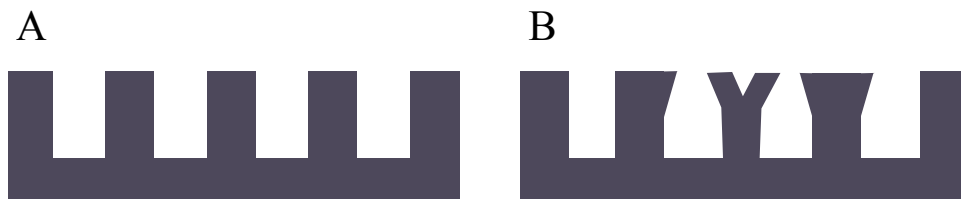


Abb. 6.1. Schematische Darstellung von A) ideal zylinderförmigen Poren und B) ungeordneten Poren.

Um ausschließen zu können, dass die Messungen durch Unregelmäßigkeiten in der Probe verfälscht werden, wurden mehrere Spektren in Abständen von je 1 mm aufgenommen. Der sich ergebende prozentuale Fehler der effektiven optischen Dicke $2n_{\text{eff}} d$ betrug 0.6 % und ist damit vernachlässigbar klein. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die porösen Aluminatproben eine gute Homogenität aufweisen.

Interferometrische Messungen von porösen Aluminaten, die über verschieden lange Anodisierungsprozesse hergestellt wurden, zeigten eine lineare Abhängigkeit der effektiven optischen Dicke von der Anodisierungsdauer. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Vereecken und Mitarbeitern gefundenen Resultat überein [98]. Mittels Ellipsometrie konnten sie einen linearen Anstieg der Schichtdicke von porösem Aluminat abhängig von der Anodisierungsdauer nachweisen. Gao et al. fanden das

gleiche Ergebnis für mikroporöses Silizium. Sie untersuchten poröses p-dotiertes Silizium, das über einen anodischen Prozess in ethanolischer HF-Lösung hergestellt wurde. Die Untersuchung der Proben, die nach unterschiedlich langen Anodisierungsprozessen erhalten wurden, erfolgte mittels Interferometrie [94]. Über dieses Experiment konnte die Gültigkeit des verwendeten Aufbaus zur Präparation poröser Aluminate nachgewiesen werden. Über die Annahme einer Porösität von 16 % wurde aus der Steigung eine Porenwachstumsrate von 2.1 $\mu\text{m/h}$ ermittelt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem zuvor erhaltenen Ergebnis sowie mit dem von Gösele und Mitarbeitern ermittelten überein [82-85].

6.1.4 Impedanzspektroskopische Untersuchungen

Einfluss des Elektrolyten

Impedanzspektroskopische Messungen von porösem Aluminat in halogenidhaltigen Elektrolytlösungen zeigten kein über einfache passive Bauelemente erklärbares Verhalten, das zudem keine gute Reproduzierbarkeit aufwies. De Wit und Lenderink gehen zur Beschreibung eines Impedanzspektrums von passiviertem Aluminat in Schwefelsäure, Phosphatlösungen oder Phosphorsäure von mindestens drei verschiedenen Zeitkonstanten aus. Die bei niedrigen Frequenzen auftretende Zeitkonstante ist nach ihren Angaben nicht sehr reproduzierbar. Der Ursprung der verschiedenen Zeitkonstanten sei bislang jedoch nicht geklärt [113].

Zur weiteren Charakterisierung des Impedanzverhaltens bei niedrigen Frequenzen wurde eine Untersuchung eines porösen Aluminats bei konstanter Frequenz f von 1 Hz in Natriumchlorid durchgeführt. Die Messung zeigte ein sprunghaftes Abfallen des Betrages der Impedanz $|Z|$ sowie ein Ansteigen der Phasenverschiebung φ . Dies ist auf eine Veränderung der Probeneigenschaften zurückzuführen, die über einzelne Defektstellen der Oxidschicht aufgrund von Korrosionseffekten hervorgerufen werden könnte. Diese Vermutung wird durch Literaturdaten aus der Materialforschung unterstützt, in denen Aluminium einer Natriumchloridlösung ausgesetzt wird, um die Korrosionsbeständigkeit des Aluminiums zu überprüfen [114-116]. Li et al. ermittelten den Grad der Korrosion sowie die Korrosionstiefe von versiegeltem Aluminium mittels elektrischer Impedanzspektroskopie und optischer Mikroskopie. Als Testlösung verwendeten sie 5 % NaCl und 0.5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [116]. Venugopal und Raja untersuchten Aluminium mit 0.05 w% Indium, das mit Harz behandelt wurde, in 3.5 % NaCl-Lösung unter Zugabe von In^{3+} mittels Potential-Zeit-Messungen, elektrischer Impedanzspektroskopie und Rasterelektronenmikroskopie. Sie gehen davon aus, dass neben In^{3+} während der Auflösung und

Ablagerung In^+ und In^{2+} entstehen. Die Inkorporation dieser Ionen verändert die Defektstruktur des passivierenden Films, als Folge steigt die Zahl der Anionenlöcher, während die Elektronenzahl sinkt. In der Gegenwart von Chloriden werden diese bei Zugabe von Indium entstehenden Anionenlöcher durch Cl^- ersetzt, was zu einem Bruch des passivierenden Films führt [114].

Die Korrosionseffekte traten sowohl an elektropolierten als auch an porösen Aluminaten auf, waren jedoch im Fall poröser Proben weniger ausgeprägt. Dies ist auf die dickere Oxidschicht zurückzuführen, die das Aluminium gegenüber Korrosionseffekten passiviert. Die Oxiddicke scheint jedoch nicht ausreichend groß zu sein, um die auftretenden Korrosionseffekte zu vermeiden. Kim et al. untersuchten poröse Aluminate mit unterschiedlicher Oxiddicke. Sie fanden eine deutliche Veränderung des Korrosionspotentials¹⁵ E_{corr} poröser Aluminate infolge des Anodisierungsprozesses im Vergleich zu Aluminaten mit einer nativen Oxidschicht, die sowohl auf die zunehmende Oxiddicke als auch auf den erhöhten Widerstand zurückzuführen ist [115].

In halogenidfreien Elektrolytlösungen wird der beschriebene Effekt dagegen nicht beobachtet. Die Korrosion scheint im Fall von porösem Aluminat von Halogeniden induziert zu werden. Alle nachfolgenden Messungen an Aluminaten wurden daher ohne Verwendung von Halogeniden durchgeführt.

Elektrochemisches Modell von porösem Aluminat

Um Informationen über die elektrischen Eigenschaften von porösem Aluminat zu bekommen, hat sich die elektrische Impedanzspektroskopie als sehr nützlich erwiesen [54, 66, 95-98]. Obwohl mehrere unterschiedliche Ersatzschaltbilder in der Literatur verwendet werden, die das Impedanzverhalten von porösem Aluminat beschreiben, wird die Frage nach der aktiven elektrisch gemessenen Fläche nicht näher erläutert. Zur Berechnung der elektrischen Parameter einer auf die porösen Substrate aufgetragenen Lipiddoppelschicht ist die aktive Fläche jedoch erforderlich, um flächenunabhängige spezifische elektrische Parameter der Lipidmembranen zu ermitteln. Aus den Impedanzergebnissen, die von planaren Barriereoxiden sowie von unterschiedlich dicken porösen Aluminatschichten erhalten wurden, ist klar ersichtlich, dass nur die Barrierschicht unterhalb der Poren im untersuchten Frequenzrahmen nachgewiesen werden kann. Dasselbe Ergebnis wurde von De Laet et al. gefunden. Sie untersuchten poröses und planares Aluminat mittels elektrischer Impedanzspektroskopie und erhielten nahezu identische Spektren [98].

¹⁵ Das Korrosionspotential bezeichnet das Gleichgewichtspotential eines sich aktiv auflösenden Metalls [117].

Zur Auswertung der Impedanzspektren wurde ein Ersatzschaltkreis verwendet, der sowohl die elektrischen Eigenschaften des Kanalfeldes als auch der Barrierschicht des porösen Aluminats berücksichtigt. Der Ersatzschaltkreis für das Kanalfeld basiert auf dem *parallel layer* Modell [99]. Dieses Modell erlaubt eine Auswertung der Impedanzspektren des porösen Aluminats. Zudem beinhaltet dieses Modell eine Definition der aktiv gemessenen Fläche, die der durch den Dichtring begrenzten geometrischen Fläche entspricht. Die in dieser Arbeit sowie die von De Laet et al. erzielten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von Hitzig et al. [97], da nur die Barrierschicht an den Porenböden nachgewiesen werden konnte. Nach Hitzig kann dagegen sowohl das Kanalfeld als auch das Barriereoxid mittels Impedanzspektroskopie detektiert und zwischen ihnen unterschieden werden. Diese Untersuchungen wurden an porösen Aluminaten unterschiedlicher Schichtdicke vorgenommen, die ergaben, dass die Kapazität des Barriereoxids konstant bleibt, während der Widerstand des porösen Oxids steigt und dessen Kapazität mit steigender Schichtdicke abnimmt.

Ein Anpassen der Parameter des Ersatzschaltkreises (1) in Abb. 5.15 an die Daten von porösen, ungeordneten Aluminaten erzielt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Daten und Anpassung. Die erhaltenen spezifischen Kapazitäten C_b liegen bei Werten von $(0.20 \pm 0.05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$, die spezifischen Widerstände R_b sind größer $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$. Diese Werte stimmen mit den von Hoar und Wood ermittelten Werten von $0.47 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die Kapazität und Widerständen von über $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ überein [95]. Zur Bestimmung der spezifischen Parameter verwendeten sie die der Lösung ausgesetzte geometrische Fläche, die durch den Dichtring gegeben ist. Ein Vergleich der ermittelten spezifischen Parameter mit den in dieser Arbeit bestimmten ist somit gerechtfertigt. In den meisten Veröffentlichungen fehlt jedoch eine explizite Angabe der Fläche, die zur Berechnung der spezifischen Parameter verwendet wurde, so dass ein Vergleich nicht möglich ist. Unter der Annahme, dass die geometrische Fläche verwendet wurde, erhielten Mansfeld et al. Kapazitätswerte von $0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [96], während De Laet et al. unter Verwendung eines CPE anstelle eines Kondensators A_b -Werte von $0.94\text{--}1.03 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen Faktor $\alpha = 0.94\text{--}0.95$ ermittelten [98].

Ausdünnvorgang

Um eine Lipiddoppelschicht mit einer spezifischen Kapazität von etwa $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ sensitiv auf einem porösen Aluminat nachweisen zu können, müssen die Kapazitätswerte des Aluminatsubstrates erhöht werden. Ein Ausdünnprozess, der von Nielsch et al. erstmals beschrieben wurde [82], erzeugt Dendriten-ähnliche Strukturen in der Barrierschicht, wodurch die Dicke der Barrierschicht abnimmt. Zum ersten Mal wurde eine impedanzspektroskopische Untersuchung der

verschiedenen Stadien dieses Prozesses durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Übereinstimmung zwischen Daten und Anpassung mit kleiner werdendem Potential geringer wurde, wenn der Ersatzschaltkreis (1) benutzt wurde. Dies könnte auf der Bildung der Dendriten-ähnlichen Strukturen an den Porenböden beruhen, die die Fraktalität des Systems erheblich steigert. Diese Abweichung von einer idealen Kapazität lässt sich im Modell berücksichtigen, indem die Kapazität C_b im Ersatzschaltbild (1) durch ein *constant phase* Element (CPE) ersetzt wird [54]. Eine Anpassung der Parameter des so modifizierten Ersatzschaltkreises (2) an die Daten führt zu einer guten Übereinstimmung. Interessanterweise nimmt der Wert α mit fallendem Potential ab. Obwohl der Ursprung des *Constant Phase* Elements noch nicht geklärt ist und in der Literatur kontrovers diskutiert wird, gibt es einige Hinweise darauf, dass die Rauigkeit der Elektrode zu diesem Verhalten beiträgt. Kerner und Pajkossy [57] fanden durch Experimente an mechanisch aufgerauhtem Gold sowie aufgerauhten und getempertem Goldproben, dass das CPE auf Oberflächeninhomogenitäten atomarer Skala beruht und nicht wie zuvor angenommen auf einer Rauigkeit größerer Skala. Ein zusätzlicher Faktor sei die spezifische Anionenadsorption. Im Falle einer glatten Oberfläche und fehlender Anionenadsorption verschwinde die Dispersion. Zu einem ähnlichen Schluss kamen Sadkowski et al. [62, 68], die das Auftreten des CPEs neben der Fraktalität der Oberfläche auf Faktoren wie Adsorption von Elektrolytkomponenten, Lösungsmittelleffekten sowie auf das Elektrodenpotential zurückführten. Die Ansicht, dass das Auftreten des CPEs auf die Oberflächenrauigkeit zurückzuführen ist, wird von Diao et al. geteilt [55]. Sie nutzen den Parameter α , um den Grad der Unordnung von Thiolschichten auf Gold zu bestimmen. Direkt nach Zugabe der Thiollösung verzeichneten sie einen starken Anstieg von α , gefolgt von einer langsamen Annäherung an den Endwert. Sie führten dies auf die schnelle Adsorption und den langsamen Kristallisationsprozess zurück.

Die Abnahme des Wertes α könnte daher die in der Barrierschicht entstehende Mikrostruktur widerspiegeln und als semi-quantitativer Indikator für die zunehmende Inhomogenität mit abnehmender Spannung gesehen werden. Der Wert α variiert typischerweise im Bereich zwischen 0.99-0.90 und kann somit näherungsweise gleich 1 gesetzt werden. Aus diesem Grund kann der Parameter A_b in einer ersten Annäherung als Kapazität behandelt werden. Da unter Annahme eines Plattenkondensators die Kapazität invers proportional zur Dicke ist, kann das erfolgreiche Ausdünnen aus der Tatsache gefolgert werden, dass der Parameter A_b mit fallendem Potential erheblich steigt. Ein großer A_b -Wert ist eine Voraussetzung für einen sensitiven Nachweis einer Lipidschicht auf dem porösen Substrat.

6.2 Charakterisierung von Lipidmembranen auf porösen Aluminaten

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung porenüberspannender Lipidmembranen auf porösen Aluminaten. Zur Präparation von Lipiddoppelschichten auf porösen Aluminatsubstraten ist das Vesikelspreiten eine geeignete Methode, da der Größenausschluss zusammen mit einer Funktionalisierung der oberen Oberfläche des porösen Aluminats die Bildung einer Lipidschicht innerhalb der Poren, wie sie von Proux-Delrouyre et al. [118] beobachtet wurde, verhindert. Zudem erlauben Vesikel die Insertion von Membranproteinen, und die erhaltenen planaren Lipiddoppelschichten sind lösungsmittelfrei. Um eine Vesikeladhäsion und das Spreiten über elektrostatische Wechselwirkungen zu induzieren, müssen die Oberflächen geladen sein. Dies kann durch Funktionalisierung der Oberfläche mit negativ bzw. positiv geladenen Molekülen erfolgen sowie durch das Anlegen einer Spannung zwischen Referenzelektrode und der Oberfläche [43, 52]. Ein weiterer Ansatz zur Präparation einer Lipidmembran mittels Vesikelfusion besteht in der Verwendung von Lipiden, die eine Thiolgruppe an der Kopfgruppe besitzen.

6.2.1 Lipidmembranen in der Literatur

Der Nachweis der porenüberspannenden Lipidmembranen erfolgte mittels Rasterkraftmikroskopie und elektrischer Impedanzspektroskopie. Zu einer impedanzspektroskopischen Untersuchung porenüberspannender Lipidmembranen existieren bislang keine Veröffentlichungen, so dass ein Vergleich der erhaltenen Daten mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen nicht möglich ist. Ein System, das Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist und mit dem ein Vergleich am ehesten gerechtfertigt erscheint, besteht in den festkörpergestützten Membranen. Eine theoretische Abschätzung der Membrankapazität unter der Annahme, dass sich das System über einen Plattenkondensator beschreiben lässt und die Membran eine Dicke von 4-6 nm [111] sowie eine Dielektrizitätskonstante von 2.0 - 2.2 [119] aufweist, ergibt eine Kapazität von 0.30 – 0.49 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Untersuchungen zeigen, dass Lipidschichten, die mittels der BLM-Technik erhalten werden, Kapazitäten erzielen, die im Bereich der theoretisch abgeschätzten Kapazität liegen [120, 121]. Lipiddoppelschichten, die durch Vesikelspreiten und -fusion auf hydrophilen Oberflächen hergestellt werden, weisen jedoch im allgemeinen größere Kapazitäten auf als die durch die theoretische Abschätzung erhaltene. So veröffentlichten Wiegand et al. [7] Membrankapazitäten von 0.74 – 1.12 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und Widerstände

zwischen $10^3 - 10^5 \Omega \text{ cm}^2$ für Lipiddoppelschichten auf Halbleitern und mit MUA funktionalisierten Goldoberflächen.

Lipiddoppelschichten aus N,N-Dimethyl-N,N-dioctadecylammoniumbromid (DODAB) erzielen auf mit MPA funktionalisierten Goldelektroden Membrankapazitäten von $1.0 - 1.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [52, 122], während die Fusion von DMPG/ DMPE-Vesikeln auf einer positiv geladenen MEA-Schicht eine Kapazität von $0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ liefert [2]. Die experimentell erhaltenen Kapazitäten sind größer als die theoretisch abgeschätzte. Dies wird auf eine unvollständige Vesikelfusion zurückgeführt, die Defektstrukturen in der Doppelschicht hervorruft. Die gesteigerte Anzahl von Defekten und der dadurch erhöhte Wassergehalt innerhalb der Lipiddoppelschicht führt zu einer größeren effektiven Dielektrizitätskonstante. Fromherz et al. haben dieses Problem durch die Adhäsion eines einzigen *Giant Vesicles* an einem geöffneten Gate eines Transistors gelöst. Die Lipidmembran behält ihre Form, ohne zu reißen und adhärierte aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung auf dem kationischen Polylysin-Film. Sie erhielten eine Kapazität von $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, da eine Fusion von mehreren Vesikeln für die Doppelschichtausbildung nicht benötigt wird [44]. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass die mittels Vesikelfusion erhaltenen Lipiddoppelschichten aufgrund unvollständiger Vesikelfusion nicht defektfrei sind. Purucker et al. konnten Lipiddoppelschichten über Vesikelfusion auf ebenen Silizium-Siliziumdioxid-Oberflächen mit Membrankapazitäten von $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ herstellen [123]. In diesem Fall sind die wenigen Defektstellen wahrscheinlich auf die niedrige Rauigkeit des Substrates zurückzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Kapazitäten sind am ehesten mit denen zu vergleichen, die über das Spreiten und Fusionieren von geladenen Vesikeln erhalten werden und typischerweise einen Wert von $0.9 - 1.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ erreichen.

6.2.2 Lipidmembranen auf funktionalisierten Oberflächen

Ein erster Ansatz zur Präparation porenüberspannender Lipidmembranen und der anschließenden impedanzspektroskopischen Charakterisierung bestand im Spreiten und der Fusion von DODAB-Vesikeln. Es ist bekannt, dass DODAB auf mit MPA funktionalisierten Goldelektroden Doppelschichtstrukturen ausbildet, die Membrankapazitäten von $1.0 - 1.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ aufweisen [52, 122]. Zudem konnte Hennesthal mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops beweisen, dass die Fusion von DODAB-Vesikeln auf MPA-funktionalisiertem porösem Aluminat zu porenüberspannenden Lipidmembranen führt [50]. Die obere Oberfläche des

Aluminats wurde zunächst mit einer dünnen Goldschicht bedeckt, um eine spezifische Funktionalisierung der Porenstege durch Chemisorption von Thiolgruppen zu erlauben. Es wurde MPA chemisorbiert und die Oberfläche mit DODAB-Vesikeln inkubiert. Die erhaltenen porenüberspannenden Lipidschichten wiesen eine hohe mechanische Stabilität auf und blieben über den untersuchten Messzeitraum von einigen Stunden unverändert. In Anlehnung an diese Arbeit wurden daher zunächst DODAB-Schichten präpariert, die mittels elektrischer Impedanzspektroskopie untersucht wurden. Die nominelle Größe der Vesikel betrug 100 nm. Nach MacDonald et al. besitzen die Vesikel damit eine Größe von (80 ± 25) nm [23], was die Porengröße von (35 ± 8) nm um einen Faktor von 2 übersteigt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Vesikel aufgrund des Größenausschlusses nicht in die Poren diffundieren. Nach dem Aufbringen der Lipidschicht nahm die Impedanz im Bereich kleiner Frequenzen jedoch ab, was im Widerspruch zu den auf planaren Goldelektroden untersuchten Lipidschichten steht. Wie in Kap. 5.1.4 beschrieben, zeigen Korrosionsforschungen an Aluminium und Aluminaten eine erhöhte Korrosion, wenn das Material halogenidhaltigen Lösungen ausgesetzt wird [114-116]. Es wird geschlossen, dass das beobachtete Impedanzverhalten auf Korrosionseffekte zurückzuführen ist, die durch das im DODAB enthaltene Bromid hervorgerufen werden.

Um das Bromid aus der Lipidlösung zu entfernen, wurde eine Fällungsreaktion mit Silbernitratlösung durchgeführt, was zu einem Austausch von Bromid durch Nitrat führen sollte. Eine Messung porösen Aluminats bei konstanter Frequenz f von 1 Hz während des Inkubationsprozesses mit DODAN-Vesikeln zeigte jedoch weiterhin ein sprunghaftes Abfallen des Betrags der Impedanz sowie ein Ansteigen der Phasenverschiebung, was darauf schließen lässt, dass die Fällungsreaktion nicht vollständig ist und weiterhin Br^- -Ionen in der Lösung vorhanden sind.

Da die Halogenid-Gegenionen von positiv geladenen Lipiden eine irreversible Veränderung des Aluminatsubstrats hervorrufen, wurden im weiteren negativ geladene Lipide auf einer mit 11-Amino-undecanthiol (MUA) funktionalisierten Oberfläche verwendet. Der pH-Wert des verwendeten Puffers wurde so eingestellt, dass die MUA-Schicht zu über 99 % in der protonierten Form vorliegt und damit eine positiv geladene Oberfläche erhalten wird. Eine Überprüfung des Präparationsverfahrens auf planaren Goldelektroden lieferte eine Kapazität von $0.95 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dies entspricht dem von Wiegand et al. erhaltenen Wert. Sie untersuchten mit MUA funktionalisierte Goldelektroden, die mit DOPC/ DOTAP-Vesikeln inkubiert wurden, mittels elektrischer Impedanzspektroskopie und erzielten Kapazitäten von $0.86\text{-}1.12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [7]. Bei einer Übertragung dieser Präparation auf poröses Aluminat konnte jedoch keine Veränderung des Impedanzspektrums nach

der Inkubation des Substrates mit Vesikeln nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass keine defektarme Lipidmembran auf dem porösen Substrat ausgebildet wurde. Der Grund könnte unter anderem in der zu geringen Oberflächenladungsdichte begründet liegen, da eine Funktionalisierung lediglich auf den Porenstegen stattfindet und nicht wie im Fall des Goldsubstrates auf der gesamten Oberfläche. Die Oberflächenladung eines porösen funktionalisierten Substrats beträgt für ungeordnete Substrate mit einer Porösität von $(17 \pm 3) \%$ im Vergleich zur Oberflächenladung einer funktionalisierten Goldelektrode nur etwa 83 %.

6.2.3 Fusion von *Giant Vesicles*

Die Präparation von planaren Lipiddoppelschichten auf porösen Oberflächen ausgehend von unilamellaren *Giant Vesicles* sollte prinzipiell die Bildung einzelner porenüberspannender Lipiddoppelschichten erlauben. Eine Funktionalisierung der Porenstege des porösen Aluminats mit positiv geladenem 3-Mercaptoethylamin lieferte jedoch nach der Inkubation des funktionalisierten Substrats mit *Giant Vesicles* kein verändertes Impedanzspektrum, woraus geschlossen werden kann, dass die Inkubation nicht zur Ausbildung einer Lipidschicht führte. Das Anlegen einer positiven Spannung von +100 mV an das Substrat führte dagegen zu einer deutlichen Veränderung der Impedanzspektren nach Inkubation mit Vesikeln im Vergleich zu denen des Aluminatsubstrates vor der Vesikelinkubation.

Die über Ersatzschaltkreis (6) bestimmten Kapazitäten, die nach der Inkubation der Probe mit *Giant Vesicles* erhalten wurden, sind um einen Faktor 2 größer als solche von festkörpergestützten Membranen auf Gold oder Halbleiteroberflächen. Die größere Kapazität lässt auf eine unvollständige Oberflächenbelegung schließen. Die insgesamt gemessene Kapazität setzt sich aus der Summe der Kapazitäten der Lipiddoppelschicht mit einer Dielektrizitätskonstanten ϵ_r der Kohlenwasserstoffketten von 2 und den mit Wasser belegten Defektstellen mit einer Dielektrizitätskonstanten ϵ_r von 80 zusammen. Um die Oberflächenbelegung Θ abzuschätzen, wird eine parallele Kombination zweier Kapazitäten, die die defektfreie Lipiddoppelschicht C_b ($0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) und die Defektstellen C_d ($4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$), die hauptsächlich durch die Barrierschicht gegeben werden, beschreiben, angenommen:

$$\Theta = \frac{C - C_d}{C_b - C_d} \quad (6.1)$$

C ist die gemessene Kapazität der Lipidschicht. Die Oberflächenbelegung Θ für *Giant Vesicles* beträgt dann etwa 48 – 50 %.

Schmidt et al. präparierten *Giant Vesicles* in 200 mM Sorbitol und ersetzten das umgebende Medium auf einer Säule durch Reinstwasser [43]. Dies hat eine Änderung des osmotischen Drucks zur Folge, der das Spreiten der Vesikel unterstützen sollte. Die impedanzspektroskopische Untersuchung von Aluminaten, die mit so präparierten Vesikeln inkubiert wurden, ergab eine Oberflächenbelegung Θ von bis zu 40 %. Die erhaltene Oberflächenbelegung liegt in der gleichen Größenordnung wie die, die über Inkubation der Aluminate mit in Wasser präparierten *Giant Vesicles* erhalten wurde. Der osmotische Effekt scheint somit im Fall der *Giant Vesicles* keinen elektrochemisch nachweisbaren Einfluss auf das Spreitverhalten zu haben.

Ein weiterer Faktor, der einen Einfluss auf das Spreiten von Vesikeln hat, ist ihre Größe. Um diesen Einfluss näher zu beleuchten, wurden poröse Aluminate untersucht, die mit *Giant Vesicles* mit einem Durchmesser von 1 μm bzw. $> 3 \mu\text{m}$ inkubiert wurden. Die erreichten Oberflächenbelegungen betrugen bis zu 40 % im Fall der 1 μm großen und bis zu 70 % für die $> 3 \mu\text{m}$ großen Vesikel. Dies lässt darauf schließen, dass hauptsächlich die Vesikel mit einer Größe über 3 μm zur Ausbildung einer oberflächengebundenen Lipidstruktur beitragen.

Singer et al. und Demel et al. fanden, dass Cholesterol einen stabilisierenden Einfluss auf die Vesikel hat [10, 102], was das Spreiten der Vesikel erschwert. In einem weiteren Ansatz wurde das in den *Giant Vesicles* enthaltene Cholesterol durch 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (Lyso-PC) ersetzt, von dem erwartet wird, das Spreitverhalten zu fördern. Schichten, die über das Spreiten dieser Vesikel auf planaren Goldelektroden hergestellt wurden, wiesen eine Kapazität von 2.2 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf, die erreichte Kapazität ist somit um einen Faktor von 2 größer als die für eine defektarme Membran erwartete Kapazität. Eine Übertragung der Präparation auf das poröse Aluminat liefert Oberflächenbelegungen bis zu 66 % und liegt damit im selben Größenbereich wie die Oberflächenbelegungen, die durch Inkubation des Substrates mit *Giant Vesicles* der Mischungen 1 oder 2 (Kap. 5.2.5) erhalten wurden. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es sein, dass der Einfluss des Cholesterols im Fall von *Giant Vesicles* auf das Spreitverhalten nicht so erheblich ist, dass es impedanzspektroskopisch messbare Auswirkungen zeigt. Eine andere Erklärung könnte in den von Wiegand et al. veröffentlichten Ergebnissen liegen. Sie untersuchten p-dotierte Siliziumsubstrate, die mit DOTAP/ Cholesterol-Vesikeln variierenden Cholesterolgehalts inkubiert wurden, mittels elektrischer Impedanzspektroskopie. Sie erhielten einen signifikanten Anstieg des Membranwiderstandes R_m mit steigendem Cholesterolgehalt, der nicht alleine durch

die Abnahme des Anteils an geladenem Lipid erklärbar ist und schlossen daraus, dass Cholesterol Defektstellen in der Membran ausheilt [7].

Feder et al. untersuchten das Spreiten von *Giant Vesicles* aus neutralen Lipiden auf mit Avidin bedeckten Festkörpern mittels Reflektionsinterferenz-Kontrastmikroskopie. Sie fanden heraus, dass *Giant Vesicles* für mittelmässig starke Adhäsionen ihre ursprüngliche Topologie während des Spreitens beibehalten, jedoch flacher werden und fraktalähnliche Strukturen ausbilden, die Ähnlichkeit mit Fingern aufweisen. Ist die Anziehung zu stark, bersten die Vesikel, bei zu schwacher Anziehung wird keine Adhäsion beobachtet [124]. Es ist denkbar, dass nicht alle *Giant Vesicles* so stark auf der Oberfläche adherieren, dass sie spreiten und zu planaren Lipiddoppelschichten fusionieren. Strukturelle Inhomogenitäten und somit Defekte in der Lipiddoppelschichtstruktur wären die Folge.

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen bestätigen, dass die *Giant Vesicles* wie von Feder et al. beschrieben zum Teil bersten, zum Teil weiterhin in ihrer ursprünglichen Form vorliegen [124]. Stellenweise bilden sich porenüberspannende Lipiddoppelschichten aus.

6.2.4 Lipidmembranen auf porenüberspannenden Polyelektrolytschichten

Die Herstellung porenüberspannender Membranen auf porösen Aluminaten durch Vesikelfusion, die durch elektrostatische Anziehung zwischen Substrat und *Giant Vesicles* induziert wurde, zeigt die Möglichkeit auf, Lipidmembranen auf den porösen Aluminatsubstraten herzustellen. Die entstehenden Lipidschichten wiesen jedoch viele Defektstellen und Inhomogenitäten auf. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen bestätigen, dass die Lipide nicht wie angenommen lediglich Doppelschichtstrukturen ausbilden, sondern zudem als Multischichten und adhärierten Vesikeln auf der Oberfläche vorliegen. Dies könnte auf die Porösität sowie die Rauigkeit der Oberfläche zurückzuführen sein. In einem weiteren Ansatz wurden daher Polyelektrolytkissen zwischen dem porösen Aluminatsubstrat und der Lipidschicht aufgebracht, von denen erwartet wird, dass sie die Poren überspannen und eine homogene Oberfläche ausbilden. Aufgrund der Ladung der Polyelektrolyte sollte es möglich sein, das Spreiten geladener Vesikel auf den Schichten zu induzieren, während der Vorteil der zwei Kompartimente aufgrund der hohen Ionendurchlässigkeit bestehen bleiben sollte. Abb. 6.2 zeigt eine Modellvorstellung der polyelektrolytgestützten Lipiddoppelschichten auf porösen Aluminaten.

Bei festkörpergestützten Membranen werden die beschriebenen Polyelektrolytkissen bereits vielfach eingesetzt, um die laterale Diffusion der Lipide zu erhalten und den Einbau von integralen Proteinen zu ermöglichen. In wässriger Umgebung quellen die Polyelektrolyte auf eine Dicke von einigen Nanometern auf und bilden somit ein deformierbares und mobiles Substrat für die Biomembran [5].

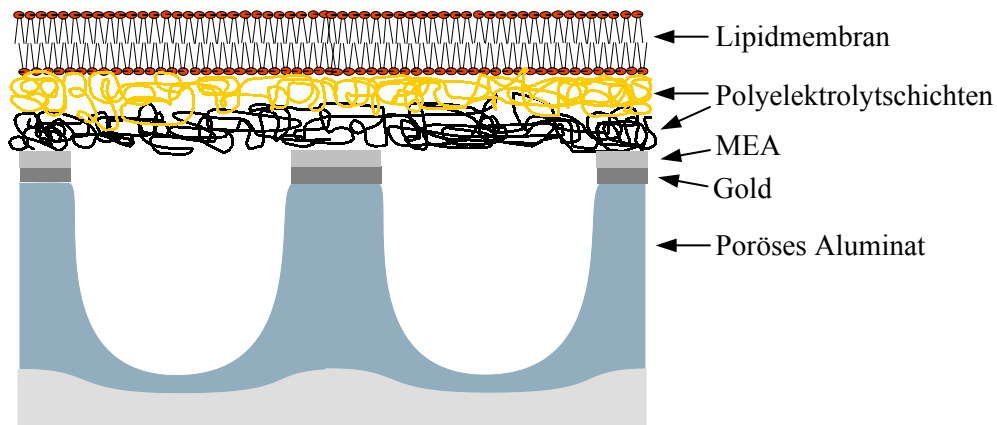


Abb. 6.2. Modell für polyelektrolytgestützte Lipiddoppelschichten auf goldbelegten und mit MEA funktionalisierten porösen Aluminaten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind lediglich zwei Polyelektrolytschichten dargestellt.

Polyelektrolytschichten auf planaren Goldelektroden

Eine Möglichkeit zum Aufbau von Polyelektrolytschichten besteht in der alternierenden Adsorption entgegengesetzt geladener Polyelektrolyten an Oberflächen. Auf diese Weise lassen sich Schichten kontrollierbarer Dicke im Bereich von einigen Nanometern herstellen [104]. Die durch diese *layer-by-layer*-Technik hergestellten Filme haben charakteristischerweise einen niedrigeren Grad an molekularer struktureller Ordnung als Langmuir-Blodgett-Filme, bieten jedoch den Vorteil hoher chemischer und physikalischer Belastbarkeit und sind einfach zu präparieren [125]. Aus diesem Grund wurden die Polyelektrolytschichten mittels dieser Technik auf die Oberflächen aufgebracht. Eine qualitative Überprüfung der *layer-by-layer*-Präparation von Polyelektrolytschichten erfolgte über Quarzmikrowaage-Messungen. Die Messungen zeigten die prinzipielle Möglichkeit, Polyelektrolyt-Multischichten aus Polyethylenimin (PEI) und Polystyrolsulfonat (PSS) herzustellen. Die auftretenden Frequenzänderungen sind jedoch mit einem Fehler behaftet, der auf eine veränderte Ionenstärke des Messpuffers nach Zugabe der Polyelektrolytlösung zurückzuführen ist.

Das Ziel besteht in der Präparation einer Lipidschicht auf den Polyelektrolytschichten. Das Spreiten der negativ geladenen Vesikel soll dabei über eine positive Oberflächenladung der obersten Polyelektrolytschicht induziert werden. Die Elektrolytschichten auf der Oberfläche sind jedoch stark miteinander verwoben, was zu einer gegenseitigen Ladungsabschirmung und einer geringeren Oberflächenladungsdichte von Polyelektrolyt-Multischichten im Vergleich zu einer Polyelektrolyt-Monoschicht führt. Wird der Lösung zur Präparation der obersten Polyelektrolytschicht 0.5 – 2 M NaCl oder Na₂SO₄ zugegeben, weist die entstehende Schicht eine größere Dicke auf als bei Präparation ohne Salzzugabe, da die Salzionen die gegenseitige Abstoßung der Polyelektrolytmoleküle vermindern. Weitere Polyelektrolytmoleküle können sich aus diesem Grund besser anlagern. Dies führt zu einer geringeren Durchwebung der obersten Polyelektrolytschicht mit der darunterliegenden Schicht und somit zu einer größeren Oberflächenladungsdichte. Kim et al. untersuchten Polyelektrolytschichten, die sowohl mit als auch ohne Salzzugabe präpariert wurden, mittels Rasterkraftmikroskopie. Sie konnten zeigen, dass der Zusatz von NaCl die Inhomogenitäten der Polyelektrolytschichten vergrößert [126].

Impedanzspektroskopische Untersuchungen von zwei Polyelektrolyt-Doppelschichten auf planaren, mit MEA funktionalisierten Goldelektroden zeigten keinen erkennbaren Unterschied im Vergleich zu den Spektren der MEA-Schichten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Polyelektrolyte in wässriger Umgebung in gequollenem Zustand vorliegen, was zu hoher Ionendurchlässigkeit und geringen kapazitiven Eigenschaften führt. Die beobachtete hohe Ionendurchlässigkeit stimmt mit den von Krasemann und Tieke veröffentlichten Ergebnissen überein. Sie untersuchten den Einfluss von Multischichten aus Polyallylaminhydrochlorid (PAH) und Polystyrolsulfonat (PSS) auf die Durchlässigkeit von NaCl und MgCl₂ [103]. Es stellte sich heraus, dass die Durchlässigkeitsrate beider Salze mit steigender Dicke der separierenden Schichten abnimmt, bis die Durchlässigkeit bei einer Schichtanzahl von 20 – 25 Polyelektrolytschichten nahezu konstante Werte erreicht. Die große Kapazität der Polyelektrolytschichten sollte eine Charakterisierung von polyelektrolytgestützten Lipiddoppelschichten ermöglichen.

Polyelektrolytschichten auf porösem Aluminat

Die *layer-by-layer*-Präparation von Polyelektrolyten auf porösem Aluminat wurde über rasterkraftmikroskopische Aufnahmen überprüft, da die elektrische Impedanzspektroskopie die Ausbildung der Schichten aufgrund der hohen Ionendurchlässigkeit und der geringen kapazitiven Eigenschaften nicht sehr sensitiv nachweisen kann. Untersuchungen an porösem Aluminat, auf dem 6

Doppelschichten PSS/ PEI präpariert wurden, zeigten, dass die Poren komplett mit Polyelektrolyten überspannt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Bruening und Mitarbeitern veröffentlichten überein. Sie übertrugen ihre auf planaren Goldelektroden erhaltenen Ergebnisse auf poröse Aluminate mit Porengrößen von 20 nm. Wurden 5 Doppelschichten PAH/ PSS auf poröses Aluminat aufgebracht, so wurden die Poren komplett überspannt, ohne jedoch mit Polyelektrolyten gefüllt zu sein [105, 127]. Die Bedeckung der Poren mit Polyelektrolyten wurde mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen [105, 106]. Dass die Poren nicht mit Polyelektrolyten gefüllt, sondern überspannt werden, wird auf die verzweigte Struktur der Polyelektrolyte zurückgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten impedanzspektroskopischen Untersuchungen an porösen Aluminaten ergaben ein verändertes Impedanzspektrum nach dem Aufbringen der Polyelektrolytschichten im Vergleich zu den Spektren des funktionalisierten Aluminatsubstrats. Messungen an polyelektrolytbedeckten, planaren Goldelektroden zeigten dagegen keine Änderung des Impedanzspektrums vor und nach der Präparation der Polyelektrolytschichten. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass im Fall der porösen Aluminate 6 Doppelschichten untersucht wurden, während auf den Goldelektroden lediglich 2 Doppelschichten präpariert wurden. Es ist zu erwarten, dass die höhere Schichtdicke zu einer geringeren Ionendurchlässigkeit und einem größeren kapazitiven Anteil führt. Eine weitere Erklärung könnte in den von Brüning und Mitarbeitern veröffentlichten Ergebnissen liegen. Sie fanden, dass die Anionendurchlässigkeit abfällt, wenn zusätzlich zu den 5 porenüberspannenden Polyelektrolyt-Doppelschichten weitere Polyelektrolytschichten auf die überspannten Poren aufgebracht werden. Ein Einfluss auf die Selektivität konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die für eine PAH/ Polyacrylsäure (PAA)-Membran erhaltene reduzierte Durchlässigkeit widerspricht den vorherigen Ergebnissen von PAH/ PAA-Filmen auf Goldelektroden, die kaum eine Beeinflussung durch die Multischichten zeigte [105]. Es wird vermutet, dass das Quellen von PAH/ PAA auf der Oberfläche der porösen Aluminate unterdrückt wird. Das Quellen von Filmen auf soliden Goldelektroden ist dagegen nicht eingeschränkt und resultiert vermutlich in einem offenen und hoch durchlässigen Film. Eine Unterdrückung des Quellens der Polyelektrolyte würde erklären, warum das Aufbringen von Polyelektrolytschichten auf poröses Aluminat zu einem veränderten Impedanzverhalten führt, während dies im Fall von polyelektrolytbedeckten Goldelektroden nicht beobachtet wird.

Polyelektrolytgestützte Lipidmembranen auf planaren Substraten

Die Parameter für die Ausbildung einer Lipidschicht auf den Polyelektrolyt-Multischichten wurden zunächst impedanzspektroskopisch auf planaren Goldelektroden untersucht. Es zeigte sich, dass die auftretende Änderung des Impedanzspektrums nach Inkubation der Probe mit Vesikeln stark vom Hydratisierungsgrad der Polyelektrolyte sowie von der Dicke der letzten Polyelektrolytschicht abhängt. Die Inkubation mit DOPC/ POPG bzw. DMPC/ DMPG-Vesikeln liefert nur für den Fall ein verändertes Impedanzspektrum, dass die Polyelektrolytschichten für mindestens 4 Stunden an Luft getrocknet wurden und die Lösung, die zur Präparation der letzten Schicht verwendet wurde, zwischen 0.5 und 2 M Na_2SO_4 enthielt. Die erhaltenen Oberflächenbelegungen betrugen bis zu 39 %.

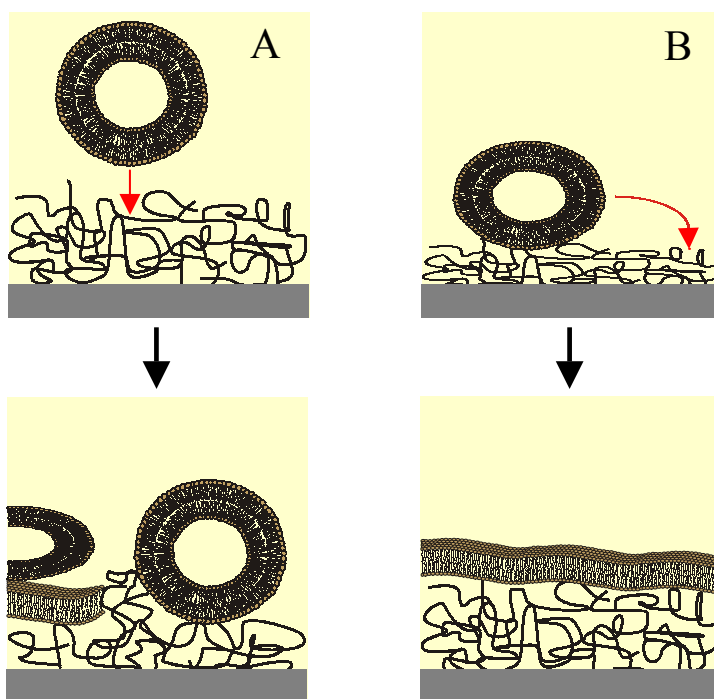


Abb. 6.3. Modell der erhaltenen Lipidstruktur auf einer A) gequollenen und B) getrockneten Polyelektrolytschicht nach [108]. Es wird vermutet, dass im Fall des gequollenen Polyelektrolyten komplexe Lipidstrukturen auf der Oberfläche entstehen und die Vesikel teilweise in die Polyelektrolytschicht eingebettet werden.

Die Abhängigkeit vom Hydratisierungsgrad kann auf das Quellen der Polyelektrolyte in wässriger Umgebung zurückgeführt werden, das mit einer verhältnismäßig großen Unebenheit der Oberfläche einhergeht. Vermutlich werden die Vesikel aufgrund dieser Inhomogenitäten in die Polyelektrolytschichten eingebettet wie in Abb. 6.3 A

schematisch dargestellt und können somit keine planaren Doppelschichtstrukturen ausbilden. Die erhaltenen Lipidstrukturen scheinen vielmehr sehr komplex zu sein. Das Trocknen der Polyelektrolyt-Multischicht an Luft lässt die Schicht dünner und ebener werden, was das Spreiten der Vesikel unterstützt. Im Fall von Polyethylenimin (PEI) beträgt die Dicke an Luft etwa 4.5 nm, in wässriger Umgebung steigt die Schichtdicke auf 15 nm an [55]. Die Vermutung, dass die Vesikel im Fall hydratisierter Proben in die Polyelektrolytschicht eingebettet werden und komplexe Strukturen ausbilden, wird von Wong et al. bestätigt [108]. Sie führten Untersuchungen an Lipidschichten aus DMPC auf PEI mittels Neutronenreflektometrie durch. Auf hydratisierten Polyelektrolyten erhielten sie komplexe Lipidstrukturen. Bei Inkubation einer getrockneten Polyelektrolytschicht mit einer Vesikelsuspension bildeten sich jedoch unter der Bedingung, dass die Vesikel schneller spreiten als die Polyelektrolytschicht hydratisiert wird, eine Lipidschicht aus. Dies ist in Abb. 6.3 B schematisch dargestellt. Es gelang ihnen, nach erfolgtem Trocknen der Polyelektrolytschicht mittels Vesikelspreiten und Fusion Oberflächenbelegungen mit einer Lipidmembran von etwa 94 % zu erzielen. Die von Wong et al. erzielte Oberflächenbelegung ist sehr viel größer als die im Rahmen dieser Arbeit erreichte. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass die mittels Neutronenreflektometrie und Impedanzspektroskopie erhaltenen Ergebnisse nur schwer miteinander verglichen werden können, da in der Neutronenreflektometrie ein Mittelwert der Belegung erhalten wird. Liegt neben nicht belegten Bereichen stellenweise eine doppelte Belegung vor, wird trotz der vorhandenen nicht belegten Bereiche eine hohe mittlere Oberflächenbelegung aus den Daten erhalten, die nicht zwangsläufig die reellen Gegebenheiten auf der Probe widerspiegeln muss. Weiterhin ist der Unterschied in den erzielten Oberflächenbelegungen darauf zurückzuführen, dass Wong et al. die Lipidmembran auf einer einzelnen Polyelektrolytschicht präparierten, während in der vorliegenden Arbeit Polyelektrolyt-Multischichten verwendet wurden, da eine einzelne Schicht die Poren des Substrates nicht überspannt. Die Ausbildung einer Lipidmembran auf einer einzelnen Polyelektrolytmembran wurde durch eine Quarzmikrowaage-Messung bestätigt. Im Fall von Multischichten tritt jedoch eine starke Durchwebung der Polyelektrolyte auf, die mit einer gegenseitigen Ladungsabschirmung der Schichten einhergeht und eine Verringerung der Oberflächenladung hervorruft. Die Oberflächenladungen der Polyelektrolytschichten, die das Vesikelspreiten induzieren, sind somit nicht vergleichbar. Um dennoch eine für das Vesikelspreiten ausreichende Oberflächenladung zu erzielen, wurde der Lösung zur Präparation der obersten Schicht 0.5 – 2 M NaCl bzw. Na₂SO₄ zugegeben. Dies führt -wie bereits diskutiert wurde- zu einer erhöhten Inhomogenität der Oberfläche [126], was dem

Einfluss des Trocknens auf das Vesikelspreiten gegenläufig ist. Die Oberfläche weist im Fall von Multischichten daher eine erheblich größere Rauigkeit auf als die von Wong et al. verwendete einzelne Polyelektrolytschicht, was das Spreiten der Vesikel erschwert und stellenweise zu einer Einbettung der Vesikel in die Polyelektrolyte führen könnte (s. Abb. 6.3A).

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an Glimmerproben, die mit 1 PSS-Schicht und 2 PEI-Schichten belegt und mit DMPC/ DMPG-Vesikeln 4:1 inkubiert wurden, bestätigen, dass nur unvollständige Lipidschichten auf den polyelektrolytbedeckten Substraten ausgebildet werden und die erhaltene Oberfläche inhomogen ist.

6.2.5 Chemisorbierte Lipidmembranen

Ausgehend von großen unilamellaren Vesikeln mit einem nominellen Durchmesser von 400 nm wurde in einem weiteren Ansatz die Oberfläche der Porenstege mit einer dünnen Goldschicht bedeckt, während die verwendeten Lipidvesikel einen Thiol-Anker besaßen, der die Chemisorption der Vesikel auf der Goldoberfläche erlaubte. Im Fall festkörperunterstützter Lipidschichten ist die laterale Beweglichkeit solcher an die Oberfläche chemisorbierten Lipide im Vergleich zu Lipiden, die eine elektrostatische Wechselwirkung mit der Oberfläche eingehen, erheblich eingeschränkt. Dies kann die Funktionalität membranständiger Komponenten, wie Rezeptoren und Ionenkanäle, beeinflussen. Solche Problematiken sollten jedoch bei porenüberspannenden Lipidmembranen nicht auftreten, da diese freitragend sind und eine Chemisorption nur auf den Porenstegen stattfindet. Abb. 6.4 zeigt ein Modell für das Vesikelspreiten von DPTE-haltigen Vesikeln auf goldbedampften porösen Aluminaten. Die Chemisorption der Lipide auf den Porenstegen führt vermutlich zu einer Deformation der Vesikel, die eine hohe Randspannung zur Folge hat. Diese wird dem Modell zufolge für das Aufspreiten der Vesikel verantwortlich gemacht.¹⁶

¹⁶ Ein anderes Modell nach S. Boxer geht im Gegensatz dazu davon aus, dass die Vesikelinnenseite nach dem Spreiten auf der Substratseite vorliegt. Dieses Modell ist im Fall der thiolipid-haltigen Vesikel jedoch schwer vorstellbar, da die Lipide bei Adhäsion der Vesikel auf der Oberfläche an dieser chemisorbieren.

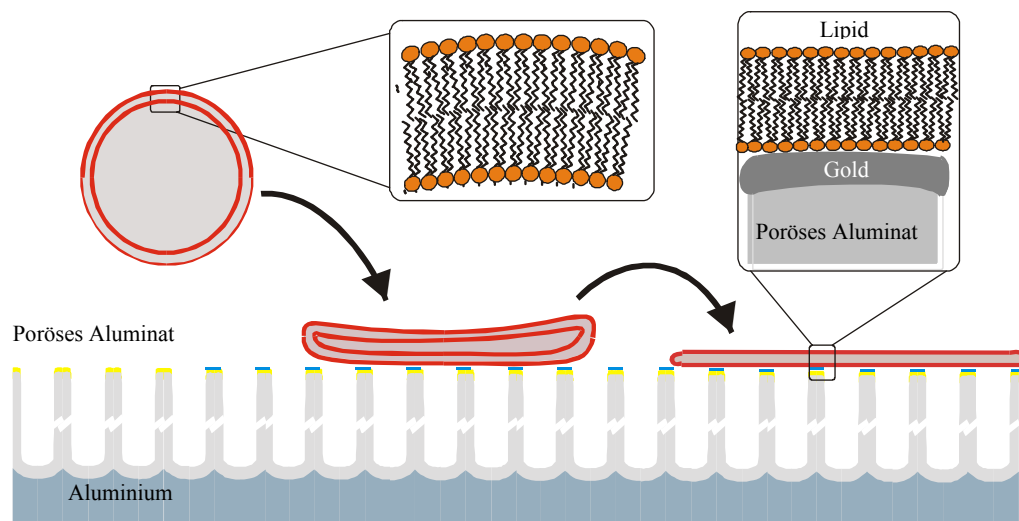


Abb. 6.4. Schematische Darstellung des Spreitens von thiolipidhaltigen Vesikeln auf einer goldbedampften porösen Aluminatoberfläche. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die festkörperunterstützte Lipidmembran auf einem Porensteg. Die Membran über den Poren ist freitragend und kann als nano-BLM angesehen werden.

Bei der Verwendung von 400 nm Vesikeln ist die Tendenz der Vesikel, in die Poren zu diffundieren, aufgrund des Größenausschlusses sehr klein, während eine starke Affinität der Vesikel zur oberen Goldoberfläche vorliegt. Um ein optimiertes System zu entwickeln, wurden die aus DPPTE und DOPC zusammengesetzten Vesikel mit variierendem Anteil von DPPTE auf planaren Goldelektroden inkubiert und impedanzspektroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass ein Anteil von mindestens 52 mol% DPPTE benötigt wird, um nahezu defektfreie planare Lipiddoppelschichten mit Kapazitäten von $(1.0 \pm 0.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ zu erhalten. Dieses optimierte System wurde auf nicht geordnete poröse Aluminatsubstrate mit einer Porösität von $(17 \pm 3) \%$ übertragen. Die Datenanalyse ergibt eine Kapazität von $0.99 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ unter Annahme des Ersatzschaltbildes (6). Die erhaltene Kapazität der Lipidmembran stimmt mit der auf den Goldelektroden überein, was auf eine komplette Oberflächenbelegung schließen lässt. Eine Berechnung ergibt eine Oberflächenbelegung θ von über 90 %. Um die Oberflächenporösität zu erhöhen und eine definiertere und weniger raue Oberfläche zu erhalten, wurden zudem hexagonal geordnete poröse Aluminatsubstrate verwendet. Obwohl die Porösität der geordneten porösen Aluminatsubstrate signifikant höher ist ($36 \pm 7 \%$) als die nicht geordneten Poren ($17 \pm 3 \%$), wurde ein ähnlicher Wert von $0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für die Membrankapazität unter Verwendung von Ersatzschaltbild (6) erhalten. Die Tatsache, dass dieselbe Kapazität der Lipidschicht auf nicht geordneten und geordneten Poren erhalten wurde - obwohl die Porösität dieser beiden Substrate einen Unterschied von 19 % aufweist -

bestätigt, dass nicht nur die Porenstege mit einer Lipiddoppelschicht bedeckt sind, sondern auch die Poren mit Membran überspannt sind. Die durch die Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes (6) an die Daten erhaltenen Membrankapazitäten können jedoch nur als erste Näherung gesehen werden, da das Modell nur eine bedingte Übereinstimmung mit den Daten zeigt. Die Gründe für diese geringe Übereinstimmung könnten in der inhomogenen Oberfläche aufgrund der Rauigkeit des porösen Materials begründet liegen. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die porenüberspannenden Membranen mit den Poren ondulieren, was zu einer dreidimensionalen Struktur der Lipidmembran auf der Oberfläche führt. Dies könnte einen weiteren Grund für die geringe Übereinstimmung zwischen Daten und Anpassung darstellen. Die auftretende Ondulation der Membran mit den Poren wurde auch von Hennesthal und Steinem beobachtet, die poröses Aluminat, das mit MPA funktionalisiert und mit DODAB-Vesikeln inkubiert wurde, mittels Rasterkraftmikroskopie untersuchten [50].

Weiterhin bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen die Ausbildung porenüberspannender Lipiddoppelschichten. Eine Höhenanalyse zeigt, dass die Rasterkraftspitze nicht in alle Poren gleich tief eindringt, was bei der Vergleichsmessung an porösen Aluminaten, die nicht mit Vesikeln inkubiert wurden, der Fall ist (s. Kap. 5.1.2). Die Höhenanalysen bestätigen somit die Ausbildung porenüberspannender Lipiddoppelschichten. Ein quantitativer Vergleich der Eindringtiefen kann jedoch nicht vorgenommen werden, da diese stark von der Spitzengeometrie abhängen.

6.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten elektrisch dichte porenüberspannende Lipiddoppelschichten präpariert und impedanzspektroskopisch nachgewiesen werden. Dies eröffnet vielfältige Möglichkeiten zur Untersuchung membrandurchspannender Proteine und damit ein breites Spektrum für zukünftige Arbeiten. Für die Untersuchung von Proteinen, die in der Membran über einer Pore vorliegen, sollten sich neben den am Protein immobilisierten Lipiden auch freie Lipide in der porenüberspannten Region der Membran befinden. Eine Abschätzung ergibt, dass sich für ein Protein mit einem Durchmesser von 5 nm etwa 370 freie Lipide über einer 20 nm großen Pore befinden. Es wurde angenommen, dass sich am Protein 50 immobilisierte Lipide befinden, die jeweils eine Fläche von 70 \AA^2 einnehmen. Die Abschätzung zeigt, dass Poren mit einer Größe von 20 nm ausreichen, um Proteine in einer freien, porenüberspannenden Membran untersuchen

zu können. Es ist somit nicht notwendig, die in dieser Arbeit vorgestellte Präparation für Untersuchungen membraninsertierter Proteine zu modifizieren.

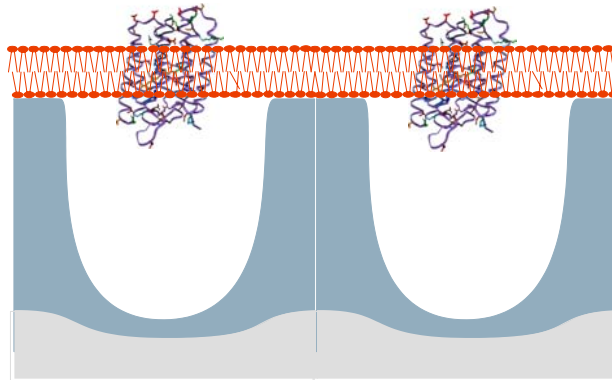


Abb. 6.5. Membrandurchspannende Proteine in einer porenüberspannenden Membran.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuen Modellmembransystems, welches die Vorteile von festkörperunterstützten und freitragenden Lipidmembranen auf Basis einer einfach herzustellenden Festkörperfläche vereint. Zur Verwirklichung dieses Ziels wurde versucht, membranüberspannte Nanokompartimente auf Basis poröser Oberflächen zu erzeugen. Als poröses Substrat wurde ungeordnetes und geordnetes Aluminat mit Porengrößen von (22 ± 6) nm bzw. (31 ± 9) nm verwendet, dessen Poren annähernd zylinderförmig sind.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die porösen Aluminate mittels der elektrischen Impedanzspektroskopie, Rasterelektronen- und Rasterkraftmikroskopie sowie Interferometrie charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurde ein Ersatzschaltkreis zur Auswertung der impedanzspektroskopischen Daten entwickelt, der die erhaltenen interferometrischen und impedanzspektroskopischen Ergebnisse zusammenführt. Zudem ermöglichte das entwickelte Modell die Beantwortung der Frage nach der aktiven Fläche, so dass im weiteren Verlauf der Untersuchungen spezifische Parameter der auf dem porösen Substrat immobilisierten Lipidschicht berechnet werden konnten. Die impedanzspektroskopischen Analysen zeigten, dass die für das poröse Aluminat erhaltenen elektrischen Parameter keinen sensitiven Nachweis einer porenüberspannenden Lipidmembran erlauben. Aus diesem Grund wurde eine elektrochemische Technik etabliert, welche die Bildung kleiner Poren in der Barrierschicht, die sich an den Porenböden befindet, zur Folge hat. Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch dieses Verfahren eine erhöhte Kapazität der Barrierschicht der Substrate erzielt wird. Die so modifizierten Träger erlauben einen sensitiven Nachweis porenüberspannender Lipidmembranen auf den porösen Substraten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, Präparationstechniken zur Herstellung von porenüberspannenden Lipidmembranen auf den porösen Substraten zu entwickeln. Der Erfolg der Präparation wurde mittels Impedanzspektroskopie verfolgt. Die Präparation der Lipidmembranen basierte auf dem Spreiten und der Fusion von Vesikeln. Um das Spreiten der Vesikel zu induzieren, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. In einem ersten Ansatz wurde versucht, negativ geladene Vesikel durch elektrostatische Wechselwirkung mit der Substratoberfläche zu fusionieren. Dies wurde durch das Anlegen einer Spannung von +100 mV an das

ungeordnete Substrat während der Inkubation mit negativ geladenen *Giant Vesicles* realisiert. Die Vesikelgröße von bis zu 25 μm gewährleistet einen Größenausschluss der Vesikel aus den Poren. Die Oberflächenbelegung mit Lipid erreichte Werte bis zu 70 %. Eine Erklärung für das unvollständige Spreitverhalten der Vesikel zu planaren porenüberspannenden Membranen wurde in der Rauigkeit der Oberfläche, die zu verstärkten Adhäsionspunkten führt und eine komplette Fusion der Membranen verhindert, gesucht. Aus diesem Grund wurden Polyelektrolytkissen zwischen den porösen Substraten und den Lipidschichten aufgebracht. Mittels Rasterkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Polyelektrolyte die Poren des Aluminats komplett überspannen, die Lipiddoppelschichten, die durch Vesikelfusion ausgebildet wurden, wiesen jedoch nur eine Oberflächenbelegung von bis zu 39 % auf. Das unvollständige Spreitverhalten der Vesikel auf den Polyelektrolyt-Multischichten wurde mit der Inhomogenität der polyelektrolytbeschichteten Oberfläche diskutiert.

In einem zweiten Ansatz wurde das Spreiten der Vesikel über Chemisorption zwischen Lipiden und der goldbelegten oberen Oberfläche des porösen Aluminats induziert. Die verwendeten Vesikel enthielten Lipide, die einen Thiolanker an der Kopfgruppe besaßen und somit an Gold chemisorbieren können. Die Untersuchungen wurden sowohl an ungeordneten als auch an geordneten Substraten durchgeführt, die eine Porösität von $(17 \pm 3) \%$ bzw. $(36 \pm 7) \%$ aufwiesen. Unabhängig von der Porösität des verwendeten Substrats wurde eine Oberflächenbelegung mit Lipid von über 90 % erreicht. Dies verdeutlicht, dass die Lipidschicht nicht nur auf den Porenstegen ausgebildet wird, sondern auch die Poren des Substrats überspannt. Die erhaltenen Impedanzspektren wiesen über mehr als 30 Stunden keine Veränderung auf. Rasterkraftmikroskopische Messungen bestätigten die Überspannung der Poren mit einer Lipidschicht.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig elektrisch dichte porenüberspannende Lipiddoppelschichten präpariert und impedanzspektroskopisch nachgewiesen werden. Dies eröffnet zahlreiche Möglichkeiten zur Untersuchung von Transportprozessen. Das entwickelte System bietet den Vorteil der hohen Langzeitstabilität der Membranen, die Möglichkeit des Aufbaus chemischer Gradienten und besitzt zwei Kompartimente, die die Inkorporation membrandurchspannender Proteine erlauben.

8 Literaturverzeichnis

1. Sackmann, E., *Supported membranes: scientific and practical applications*. Science, 1996. **271**(5245): p. 43-48.
2. Steinem, C., Janshoff, A., Ulrich, W. P., Sieber, M., Galla, H. J., *Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1279**(2): p. 169-180.
3. Knoll, W., Frank, C. W., Heibel, C., Naumann, R., Offenhausser, A., Ruhe, J., Schmidt, E. K., Shen, W. W., Sinner, A., *Functional tethered lipid bilayers*. J Biotechnol, 2000. **74**(3): p. 137-158.
4. Salamon, Z., Tollin, G., *Surface plasmon resonance studies of complex formation between cytochrome c and bovine cytochrome c oxidase incorporated into a supported planar lipid bilayer. II. Binding of cytochrome c to oxidase- containing cardiolipin/phosphatidylcholine membranes*. Biophys J, 1996. **71**: p. 858-867.
5. Majewski, J., Wong, J. Y., Park, C. K., Seitz, M., Israelachvili, J. N., Smith, G. S., *Structural studies of polymer-cushioned lipid bilayers*. Biophys J, 1998. **75**: p. 2363-2367.
6. Sackmann, E., Tanaka, M., *Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications*. Trends Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 58-64.
7. Wiegand, G., Arribas-Layton, N., Hillebrandt, H., Sackmann, E., Wagner, P., *Electrical properties of supported lipid bilayer membranes*. J. Phys. Chem. B, 2002. **106**: p. 4245-4254.
8. Hillebrandt, H., Wiegand, G., Tanaka, M., Sackmann, E., *High electric resistance polymer/lipid composite films on indium- tin- oxide electrodes*. Langmuir, 1999. **15**: p. 8451-8459.
9. Müller, P., Rudin, D. O., *Action potential phenomena in experimental bimolecular lipid membranes*. Nature, 1967. **213**(76): p. 603-604.
10. Singer, S.J., Nicolson, G. L., *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**: p. 720-731.
11. Winter, R., *Struktur und Dynamik von Modellmembranen*. Chemie in unserer Zeit, 1990. **24**: p. 71-81.
12. Radhakrishnan, A., Anderson, T. G., McConnell, H. M., *Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes*. PNAS, 2000. **97**(23): p. 12422-12427.
13. Roberts, G., *Langmuir-Blodgett-Films*. Plenum Press, New York, London, 1990(CAN 113:159692): p. 425pp.
14. Hönig, D., Möbius, D., *Direct visualization of Monolayers at the Air-Water Interface by Brewster Angle Microscopy*. J. Phys. Chem., 1991. **95**: p. 4590 - 4592.
15. Weidemann, G., Vollhardt, D., *Long-range tilt orientational order in phospholipid monolayers: a comparative study*. Biophys. J., 1996. **70**(6): p. 2758-2766.
16. Müller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., Wescott, W. C., *Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions*. J. Phys. Chem., 1963. **67**: p. 534-535.

17. Müller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., Wescott, W. C., *Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system*. Nature, 1962. **194**(4832): p. 979-980.
18. Hladky, S. B., Haydon, D. A., *Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics*. Nature, 1970. **523**(231): p. 451-453.
19. Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C., *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. Journal of molecular biology, 1965. **13**: p. 238-252.
20. Nagle, J. F., Tristram-Nagle, S., *Structure of lipid bilayers*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1469**: p. 159-195.
21. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., Cullis, P. R., *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*. Biochim Biophys Acta, 1985. **812**: p. 55-65.
22. Nayar, R., Hope, M. J., Cullis, P. R., Biochim Biophys Acta, 1989. **986**: p. 200-206.
23. MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P. M., Takeshita, K., Subbarao, N. K., Hu, L.-R., *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1061**: p. 297-303.
24. Benninghoven, A., *Chemische Analyse von anorganischen und organischen Oberflächen und von dünnen Schichten mit der statischen Flugzeit-Massenspektroskopie (TOF-SIMS)*. Angewandte Chemie, 1994. **106**: p. 1075-1096.
25. Leufgen, K. M., Rulle, H., Benninghoven, A., Sieber, M., Galla, H.-J., *Imaging Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy allows visualization and analysis of coexisting phases in Langmuir-Blodgett films*. Langmuir, 1996. **12**(7): p. 1708-1711.
26. Janshoff, A., Galla, H.-J., Steinem, C., *Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren?* Angewandte Chemie, 2000. **112**: p. 4165-4195.
27. Puu, G., Gustafson, I., *Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes-factors of importance for kinetics and stability*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1327**(2): p. 149-161.
28. Goormaghtigh, E., Raussens, V., Ruyschaert, J.-M., *Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1422**: p. 105-185.
29. Bittermann, A. G., Jacobi, S., Chi, L. F., Fuchs, H., Reichelt, R., *Contrast studies on organic monolayers of different molecular packing in FESEM and their correlation with SFM data*. Langmuir, 2001. **17**: p. 1872-1877.
30. Janshoff, A., Steinem, C., *Scanning force microscopy of artificial membranes*. Chem Bio Chem, 2001. **2**: p. 798-808.
31. Lingler, S., Rubinstein, I., Knoll, W., Offenhäusser, A., *Fusion of small unilamellar lipid vesicles to alkanethiol and thiolipid self-assembled monolayers on gold*. Langmuir, 1997. **13**: p. 7085-7091.
32. Michalke, A. K., *Impedanzspektroskopische Untersuchungen an auf Gold chemisorbierten Monoschichten im Hinblick auf mögliche analytische Anwendungen*. Diplomarbeit, 1996: Fachbereich Chemie und Pharmazie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.
33. Taborelli, M., Descouts, P., *Organic monolayers chemisorbed on gold observed by scanning probe microscopy*. Fresenius J Anal Chem, 1996. **354**: p. 777-781.
34. Sinner, E. K., Knoll, W., *Functional tethered membranes*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(6): p. 705-711.
35. Theato, P., Zentel, Rudolf, *Formation of lipid bilayers on a new amphiphilic polymer support*. Langmuir, 2000. **16**: p. 1801-1805.

36. Naumann, C. A., Prucker, O., Lehmann, T., R  he, J., Knoll, W., Frank, C.W., *The polymer-supported phospholipid bilayer: Tethering as a new approach to substrate-membrane stabilization*. Biomacromolecules, 2002. **3**: p. 27-35.
37. Cheng, Y., Ogier, S.D., Bushby, R.J., Evans, S.D., *Discrete membrane arrays*. Reviews in Molecular Biotechnology, 2000. **74**: p. 159-174.
38. Steinem, C., Janshoff, A., von dem Bruch, K., Reihs, K., Goossens, J., Galla, H.-J., *Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998. **45**: p. 17-26.
39. Steinem, C., Galla, H.-J., Janshoff, A., *Interaction of mellitin with solid supported membranes*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2000. **2**: p. 4580-4585.
40. Cheng, S., Bushby, R. J., Evans, S. D., Knowles, P. F., Miles, R. E., Ogier, S. D., *Single ion channel sensitivity in suspended bilayers on micromachined supports*. Langmuir, 2001. **17**: p. 1240-1242.
41. Ogier, S. D., Bushby, R.J., Cheng, Y., Evans, S. D., Evans, S. W., Jenkins, A. T. A., Knowles, P. F., Miles, R. E., *Suspended planar phospholipid bilayers on micromachined supports*. Langmuir, 2000. **16**: p. 5696-5701.
42. Klingler, J., Fromherz, P., *Profiles of voltage and of channel density in a planar membrane cable on micromachined silicon*. Berichte der Bunsengesellschaft f  r Physikalische Chemie, 1995. **99**(7): p. 958-964.
43. Schmidt, C., Mayer, M., Vogel, H., *A chip-based biosensor for the functional Analysis of single ion channels*. Angew. Chem., 2000. **112**(17): p. 3267-3270.
44. Fromherz, P., Kiessling, V., K  ttig, K., Zeck, G., *Membrane transistor with giant lipid vesicle touching a silicon chip*. Appl. Phys. A, 1999. **69**: p. 571-576.
45. Osborn, T. D., Yager, P., *Formation of planar solvent-free phospholipid bilayers by Langmuir-Blodgett transfer of monolayers to micromachined apertures in silicon*. Langmuir, 1995. **11**: p. 8-12.
46. Fertig, N., Tilke, A., Blick, R.H., Kotthaus, J. P., *Stable integration of isolated cell membrane patches in a nanomachined aperture*. Appl. Phys. Lett., 2000. **77**(8): p. 1218-1220.
47. Fertig, N., Meyer, C., Blick, R. H., Trautmann, C., Behrends, J. C., *Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology*. Physical Review E, 2001. **64**: p. 1-4.
48. Favero, G., D'Annibale, A., Campanella, L., Santucci, R., Ferri, T., *Membrane supported bilayer lipid membrane arrays: preparation, stability and ion-channel insertion*. Anal. Chim. Acta, 2002. **460**: p. 23-34.
49. Lieser, G., Mittler-Neher, S., Spinke, J., Knoll, W., *Electron microscopic investigations on free-standing mixed lipid Langmuir-Blodgett-Kuhn monolayers: phase separation and aging process*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1192**(1): p. 14-20.
50. Hennesthal, C., Steinem, C., *Pore-spanning lipid bilayers visualized by scanning force microscopy*. J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**: p. 8085-8086.
51. Michalke, A., Galla, H. J., Steinem, C., *Channel activity of a phytotoxin of Clavibacter michiganense ssp. nebraskense in tethered membranes*. Eur Biophys J, 2001. **30**(6): p. 421-429.
52. Michalke, A., Sch  rholz, T., Galla, H.-J., Steinem, C., *Membrane activity of an anion channel from Clavibacter michiganense ssp. nebraskense*. Langmuir, 2001. **17**: p. 2251-2257.
53. Ende, D., Mangold, K.-M., *Impedanzspektroskopie*. Chemie in unserer Zeit, 1993. **27**(3): p. 134-140.
54. Goeminne, G., Terryn, H., Vereecken, J., *Characterization of conversion layers on aluminum by means of electrochemical impedance spectroscopy*. Electrochimica Acta, 1995. **40**(4): p. 479-486.
55. Diao, P., Jiang, D., Cui, X., GU, D., Tong, R., Zhong, B., *Studies of structural disorder of self-assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltammetry and impedance*. J. Electroanal. Chem., 1999. **464**: p. 61-67.

56. Scheider, W., *Theory of the frequency dispersion of electrode polarization. Topology of networks with fractional power frequency dependence.* J. Phys. Chem. B, 1975. **79**(2): p. 127-136.
57. Kerner, Z., Pajkossy, T., *Impedance of rough capacitive electrodes: the role of surface disorder.* J. Electroanal. Chem., 1998. **448**: p. 139-142.
58. Cole, K. S., Cole, R. H., *Dispersion and absorption in dielectrics. I. Alternating-current characteristics.* J. Chem. Phys., 1941. **9**: p. 341-351.
59. Nagy, G., Schiller, R., *Dispersive change carrier mobility in a surface oxide layer.* Phys. Chem. Chem. Phys., 2002. **4**: p. 791-794.
60. Komornicki, S., Radecka, M., *Frequency-dependent electrical properties in the system $\text{SnO}_2\text{-TiO}_2$.* J. Mat. Sci.: Mat. in Electr., 2001. **12**: p. 11-16.
61. Lang, G., Heusler, K. E., *Remarks on the energetics of interfaces exhibiting constant phase element behavior.* J. Electroanal. Chem., 1998. **457**: p. 257-260.
62. Sadkowski, A., Motheo, A. J., Neves, R. S., *Characterisation of Au (111) and Au (210) aqueous solution interfaces by electrochemical impedance spectroscopy.* J. Electroanal. Chem., 1998. **455**: p. 107-119.
63. Karabaliev, M., Kochev, V., *Electrochemical investigations of cholesterol enriched glassy carbon supported thin lipid films.* Biophys. Chem., 2003. **103**: p. 157-167.
64. Zoltowski, P., *On the electrical capacitance of interfaces exhibiting constant phase element behavior.* J. Electroanal. Chem., 1998. **443**: p. 149-154.
65. de Levie, R., *Porous electrodes in electrolyte solutions. IV.* Electrochimica acta, 1964. **9**: p. 1231-1245.
66. Van der Linden, B., Terryn, H., Vereecken, J., *Investigation of anodic aluminium oxid layers by electrochemical impedance spectroscopy.* Journal of applied electrochemistry, 1990. **20**: p. 798-803.
67. Brug, G. J., Van der Eeden, A. L. G., Sluyters-Rehbach, M., Sluyters, J. H., *The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element.* J. Electroanal. Chem., 1984. **176**: p. 275-295.
68. Sadkowski, A., *On the ideal polarisability of electrodes displaying cpe-type capacitance dispersion.* J. Electroanal. Chem., 2000. **481**: p. 222-226.
69. Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C., *Atomic Force Microscope.* Phys. Rev. Lett., 1986. **56**(9): p. 930-933.
70. Künneke, S., *Kontaktmechanik und Strukturierung von festkörpergestützten Lipidmembranen.* Dissertation, 2003: Fachbereich Chemie und Pharmazie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
71. Raleigh, L., *Quartz piezoelectricity.* Vacuum, 1885. **9**: p. 261.
72. Curie, J., Curie, P., *An oscillating quartz crystal mass detector.* Rendu, 1880. **91**: p. 294-297.
73. Sauerbrey, G., *Use of quartz vibration for weighing thin films on a microbalance.* J. Phys., 1959. **155**: p. 206-212.
74. <http://www.corningfrequency.com/piezo/papers/qcao.html>.
75. Schuhmacher, R., *Die Quarzmikrowaage: Eine neue Messtechnik zur in-situ Untersuchung des Phasenbereiches fest/flüssig.* Angew. Chem., 1990. **102**: p. 347-361.
76. O'Sullivan, C. K., Guilbault, G. G., *Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications.* Biosensors and bioelectronics, 1999. **14**: p. 663-670.
77. Kastl, K., Ross, M., Gerke, V., Steinem, C., *Kinetics and thermodynamics of Annexin A1 binding to solid-supported membranes: A QCM study.* Biochem., 2002. **41**(31): p. 10087-10094.
78. Höppener, S., *Entwicklung und Charakterisierung von nanostrukturierten Bauteilen und deren potentielle Anwendungen.* Diplomarbeit, 1997: Fachbereich Physik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.

79. Augustin, L., Chi, L.-F., Fuchs, H., Höppener, S., Rakers, S., Röthig, C., Schwaak, T., Starrberg, F., *Preparation and characterization of low-dimensional nanostructures*. Appl. Surf. Sci., 1999. **141**: p. 219-227.
80. Janshoff, A., Dancil, K.-P. S., Steinem, C., Greiner, D. P., Lin, V. S.-Y., Gurtner, C., Motesharei, K., Sailor, M. J., Ghadiri, M. R., *Macroporous p-type silicon fabry-perot layers. Fabrication, characterization, and applications in biosensing*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**: p. 12108-12116.
81. Stewart, M. P., Buriak, J. M., *Chemical and biological applications of porous silicon technology*. Adv. Mater., 2000. **12**(12): p. 859-869.
82. Nielsch, K., Müller, F., Li, A.-P., Gösele, U., *Uniform nickel deposition into ordered alumina pores by pulsed electrodeposition*. Adv. Mater., 2000. **12**(8): p. 582-586.
83. Li, A. P., Müller, F., Birner, A., Nielsch, K., Gösele, U., *Polycrystalline nanopore arrays with hexagonal ordering on aluminium*. J. Vac. Sci. Technol. A, 1999. **17**(4): p. 1428-1431.
84. Li, A.-P., Müller, F., Birner, A., Nielsch, K., Gösele, U., *Hexagonal pore arrays with a 50 - 420 nm interpore distance formed by self-organization in anodic alumina*. J. Appl. Phys., 1998. **84**(11): p. 6023-6026.
85. Jessensky, O., Müller, F., Gösele, U., *Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina*. Appl. Phys. Lett., 1998. **72**(10): p. 1173-1175.
86. Jessensky, O., *Untersuchungen zum Porenwachstum in 6H-Siliziumkarbid und anodischem Aluminiumoxid*. Dissertation, 1997: Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
87. Lohrengel, M. M., *Thin anodic oxide layers on aluminium and other valve metals: high field regime*. Mat. Sci. Eng., 1993. **R 11**: p. 243-294.
88. Diggle, J. W., Downie, T. C., Goulding, C. W., *Anodic oxide films on aluminum*. Chem. Rev., 1968. **69**(3): p. 365-405.
89. Liechti, F., Treadwell, W. D., *The composition of electrolytic oxide layers on aluminum*. Helv. Chim. Acta, 1947. **30**: p. 1204-1218.
90. Masuda, H., Fukuda, K., *Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina*. Science, 1995. **268**: p. 1466-1468.
91. Serebrennikova, I., Vanysek, P., Birss, V. I., *Characterization of porous aluminum oxide films by metal electrodeposition*. Electrochimica Acta, 1997. **42**(1): p. 145-151.
92. Michalke, A., *Rezeptive Cyclodextrinmonoschichten und Ionenkanäle in Lipidmembranen*. Dissertation, 2000: Fachbereich Chemie und Pharmazie, Westfälische-Wilhelms-Universität, Münster.
93. Bruggeman, D. A. G., *The calculation of various physical constants of heterogeneous substances. I. The dielectric constants and conductivities of mixtures composed of isotropic substances*. Ann. Phys. (Leipzig), 1935. **24**: p. 636-664.
94. Gao, J., Gao, T., Li, Y. Y., Sailor, M. J., *Vapor sensors based on optical interferometry from oxidized microporous silicon films*. Langmuir, 2002. **18**: p. 2229-2233.
95. Hoar, T. P., Wood, G. C., *The sealing of porous anodic oxide films on aluminium*. Electrochimica Acta, 1962. **7**: p. 333-353.
96. Mansfeld, F., Kendig, M. W., *Evaluation of anodized aluminum surfaces with electrochemical impedance spectroscopy*. J. Electrochem. Society, 1988. **135**(4): p. 828-833.
97. Hitzig, J., Jüttner, K., Lorenz, W.J., Paatsch, W., *AC-Impedance measurements on corroded porous aluminum oxide films*. J. Electrochem. Society, 1986. **133**(5): p. 887-496.

98. De Laet, J., Terryn, H., Vereecken, J., *The use of impedance spectroscopy and optical reflection spectroscopy to study modified aluminium surfaces*. Electrochimica acta, 1996. **41**(7/8): p. 1155-1161.
99. Macdonald, J. R., *Impedance Spectroscopy*. John Wiley & Sons: New York, 1987.
100. Purucker, O., Hillebrandt, H., Adlkofer, K., Tanaka, M., *Deposition of highly resistive lipid bilayer on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac-impedance spectroscopy*. Electrochimica Acta, 2001. **47**: p. 791-798.
101. Steinem, C., Janshoff, A., Galla, H.-J., Sieber, M., *Impedance analysis of ion transport through gramicidin channels incorporated in solid supported lipid bilayers*. Bioelectrochem. Bioenerg., 1997. **42**: p. 213-220.
102. Demel, R. A., Jansen, J. W. C. M., Van Dijk, P. W. M., Van Deenen, L. L. M., *The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids*. Biochim Biophys Acta, 1977. **465**: p. 1-10.
103. Krasemann, L., Tieke, B., *Composite membranes with ultrathin separation layer prepared by self-assembly of polyelectrolytes*. Material Science and Engineering, 1999. **C 8-9**: p. 513-518.
104. Neu, B., *Alpha-Dispersion sowie Adsorption und Depletion neutraler und geladener Makromoleküle - Untersuchungen an Blutzellen*. <http://dochostrz.hu-berlin.de/dissertationen/biologie/neu-bjoern/HTML/neu-ch1.html>, 1999.
105. Harris, J. J., *Layered polyelectrolyte films as selective, ultrathin barriers for anion transport*. Chem. Mater., 2000. **12**: p. 1941-1946.
106. Xiao, K. P., Harris, J. J., Park, A., Martin, C. M., Pradeep, V., Bruening, M. L., *Formation of ultrathin, defect-free membranes by grafting of poly(acrylic acid) onto layered polyelectrolyte films*. Langmuir, 2001. **17**: p. 8236-8241.
107. Sohling, U., Schouten, A. J., *Investigation of the adsorption of Dioleoyl-L- α -phosphatidic acid mono- and bilayers from vesicle solution onto polyethylenimine-covered substrates*. Langmuir, 1996. **12**: p. 3912-3919.
108. Wong, J. Y., Majewski, J., Seitz, M., Park, C. K., Israelachvili, J. N., Smith, G. S., *Polymer-cushioned bilayers. I. A structural study of various preparation methods using neutron reflectometry*. Biophys J, 1999. **77**(3): p. 1445-1457.
109. Seitz, M., *Long-range interaction forces between polymer-supported lipid bilayer membranes*. Langmuir, 2001. **17**: p. 4616-4626.
110. Keller, C. A., Kasemo, B., *Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance*. Biophys J, 1998. **75**: p. 1397-1402.
111. Galla, H.-J., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1988. **ISBN 3-13-712301-1**.
112. Lopez, V., Otero, E., Escudero, E., Gonzalez, J. A., *Nanostructural changes in porous anodic films on aluminum during aging*. Surface and Coatings Technology, 2002. **154**: p. 34-41.
113. de Wit, J. H. W., Lenderink, H. J. W., *Electrochemical impedance spectroscopy as a tool to obtain mechanistic information on the passive behaviour of aluminium*. Electrochimica Acta, 1996. **41**(7/8): p. 1111-1119.
114. Venugopal, A., Raja, V. S., *AC impedance study on the activation mechanism of aluminium by indium and zinc in 3.5 % NaCl medium*. Corr. Sci., 1997. **39**(12): p. 2053-2065.
115. Kim, Y.-C., Quint, B., Kessler, R. W., Oelkrug, D., *Structural properties of electrochemically designed porous oxide films on AlMg1*. Journal of electroanalytical chemistry, 1999. **0**: p. 121-126.
116. Li, D., Hu, Y., Guo, B., *Study on the evaluation of localized corrosion of 2024T3 aluminum alloy with EIS*. Mat. Sci. Eng., 2000. **A280**: p. 173-176.
117. <http://docserver.bis.uni-oldenburg.de/publikationen/dissertation/2000/ducper00/pdf/kap02.pdf>.

118. Proux-Delrouyre, V., Laval, J. M., Bourdillon, C., *Formation of streptavidin-supported lipid bilayers on porous anodic alumina: electrochemical monitoring of triggered vesicle fusion*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(37): p. 9176-9177.
119. Requena, J., Haydon, D. A., *Van der Waals forces in oil-water systems from the study of thin lipid films. II. The dependence of the van der Waals free energy of thinning on film composition and structure*. Proc. Roy. Soc. London A, 1975. **347**(1649): p. 161-177.
120. Benz, R., Fröhlich, O., Läger, P., Montal, M., *Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers*. Biochim Biophys Acta, 1975. **394**: p. 323-334.
121. Bamberg, E., Benz, R., *Voltage-induced thickness changes of lipid bilayer membranes and the effect of an electric field on Gramicidin A channel formation*. Biochim Biophys Acta, 1975. **426**: p. 570-580.
122. Steinem, C., Janshoff, A., Galla, H. J., *Impedance Analysis of ion transport through gramicidin channels incorporated in solid supported lipid bilayers*. Bioelectrochem. Bioenerg., 1997. **42**: p. 213-220.
123. Purucker, O., Hillebrandt, H., Adlkofer, K., Tanaka, M., *Deposition of highly resistive lipid bilayer on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac impedance spectroscopy*. Electrochimica Acta, 2001. **47**(5): p. 791-798.
124. Feder, T. J., Weissmuller, G., Zeks, B., Sackmann, E., *Spreading of giant vesicles on moderately adhesive substrates by fingering: A reflection interference contrast microscopy study*. Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics, 1995. **51**(4): p. 3427-3433.
125. Stroeve, P., Vasquez, V., Coelho, M. A. N., Rabiolt, J. F., *Gas transfer in supported films made by molecular self-assembly of ionic polymers*. Thin solid films, 1996. **284-285**: p. 708-712.
126. Kim, D. K., Han, S. W., Kim, C. H., Hong, J. D., Kim, K., *Morphology of multilayers assembled by electrostatic attraction of oppositely charged model polyelectrolytes*. Thin solid films, 1999. **350**: p. 153-160.
127. Nagale, M., Kim, B. Y., Bruening, M. L., *Ultrathin, hyperbranched poly(acrylic acid) membranes on porous alumina supports*. J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**: p. 11670-11678.

A Anhang

A1 Berechnung der Porösität nach Bruggeman

$$\frac{n_{\text{Füllung}}^2 - n_{\text{eff}}^2}{n_{\text{Füllung}}^2 + n_{\text{eff}}^2} p + \frac{n_{\text{Alox}}^2 - n_{\text{eff}}^2}{n_{\text{Alox}}^2 + n_{\text{eff}}^2} (1 - p) = 0 \quad (5.1)$$

p bezeichnet die Porösität, n_{Alox} den Brechungsindex des Aluminats, $n_{\text{Füllung}}$ den Brechungsindex des entsprechenden Lösungsmittels und n_{eff} den effektiven Brechungsindex. Eine Auflösung nach n_{eff} ergibt:

$$n_{\text{eff}} = \frac{\sqrt{2}}{2} [2pn_{\text{Füllung}}^2 - 2pn_{\text{Alox}}^2 + n_{\text{Alox}}^2 - n_{\text{Füllung}}^2 + (4p^2n_{\text{Füllung}}^4 - 8p^2n_{\text{Füllung}}^2n_{\text{Alox}}^2 + 8pn_{\text{Füllung}}^2n_{\text{Alox}}^2 - 4pn_{\text{Füllung}}^4 + 4p^2n_{\text{Alox}}^4 - 4pn_{\text{Alox}}^4 + n_{\text{Alox}}^4 + 2n_{\text{Füllung}}^2n_{\text{Alox}}^2 + n_{\text{Füllung}}^4)^{1/2}]^{1/2}$$

Eine Multiplikation mit der zweifachen Dicke $2d$ der porösen Schicht liefert für die optische Dicke $2n_{\text{eff}}d$:

$$2n_{\text{eff}}d = \sqrt{2}d [2pn_{\text{Füllung}}^2 - 2pn_{\text{Alox}}^2 + n_{\text{Alox}}^2 - n_{\text{Füllung}}^2 + (4p^2n_{\text{Füllung}}^4 - 8p^2n_{\text{Füllung}}^2n_{\text{Alox}}^2 + 8pn_{\text{Füllung}}^2n_{\text{Alox}}^2 - 4pn_{\text{Füllung}}^4 + 4p^2n_{\text{Alox}}^4 - 4pn_{\text{Alox}}^4 + n_{\text{Alox}}^4 + 2n_{\text{Füllung}}^2n_{\text{Alox}}^2 + n_{\text{Füllung}}^4)^{1/2}]^{1/2}$$

Eine Anpassung dieser Funktion an die Daten (Abb. 5.8) erlaubt die Bestimmung der Porösität p sowie der Schichtdicke d der porösen Schicht.

A2 Physikalische Größen von AT-cut Quarzen

Symbol	Physikalische Größe	numerischer Wert
ρ_q	Dichte	2.651 g/cm ³
η_q	Viskosität	3.47·10 ⁵ g/(cm·s)
ε_{22}	Dielektrizitätskonstante	4.02·10 ⁻¹¹ C ² J ⁻¹ m ⁻¹
μ_q	piezoelektrisch versteiftes Elastizitätsmodul	2.957·10 ⁻¹⁰ N/m ²
e_{26}	piezoelektrischer Koeffizient	9.652·10 ⁻² C/m ²
K	elektromechanische Kopplungskonstante	8.888·10 ⁻²

Quelle: Janshoff (1997)

A3 Symbolverzeichnis

A	Fläche, Parameter des CPE	U	Spannung
A_F	Oberflächenänderung der Filmwaage	x	Molenbruch
A_S	Oberflächenänderung des Substrats	Z	Impedanz
C	Kapazität	$ Z $	Betrag der Impedanz
C_F	Sauerbrey-Konstante	Z'	Realteil der Impedanz
c	Konzentration	Z''	Imaginärteil der Impedanz
d	Schichtdicke	α	Koeffizient des CPE
F	Kraft	ε	Extinktionskoeffizient
f	Frequenz	ε_0	elektrische Feldkonstante
f_0	Resonanzfrequenz	ε_r	Dielektrizitätskonstante
I	Stromstärke	ε^*	Komplexe Dielektrizitätskonstante
i	Komplexe Einheit	φ	Phase
L	Induktivität	λ	Wellenlänge
M	Molare Masse	μ	Schermodul
m	Masse, Ordnung der Maxima	ρ	Dichte
N	Materialkonstante	τ	Abklingzeit, Zeitkonstante, Lebensdauer
n	Brechungsindex	τ_0	Relaxationszeit
R	Widerstand, Übertragsverhältnis	ω	Kreisfrequenz
t	Zeit	σ	Leitfähigkeit
		Θ	Oberflächenbelegung

A4 Abkürzungsverzeichnis

a.u.	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)-imino- tris(hydroxymethyl)-methan
BLM	Schwarze Membran (<i>Black lipid membrane</i>)
CPE	<i>Constant Phase</i> Element
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3- phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3- phosphoglycerol
DODAB	N,N-Dioctadecyl-N,N- dimethylammoniumbromid
DODAN	N,N-Dioctadecyl-N,N- dimethylammoniumnitrat
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPTE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3- phosphothioethanol
LB	Langmuir-Blodgett
Lyso-PC	1-Palmitoyl-2-Hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3- phosphocholin
MEA	Mercaptoethylamin
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MUA	11-Aminoundecanthiol
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PEI	Polyethylenimin
POPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
PSS	Polystyrolsulfonat
QCM	Quarzmikrowaage (<i>quartz crystal microbalance</i>)
SSM	Festkörpergestützte Membran (<i>Solid supported membrane</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

A5 Chemikalien

11-Amino-undecanthiol	bezogen über Probior (München)
Asolectin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Argon	Linde (München)
Bis-Tris	Sigma (Steinheim)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Cholesterol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Chrom	Bal Tec (Balzers, FL)
Chrom(VI)-oxid	Merck (Darmstadt)
N,N-Dioctadecyl-N,N-dimethylammoniumbromid	Sigma (Steinheim)
Ethanol	Fluka (Neu-Ulm)
Gold	Degussa (Hanau)
	Elektronen Optic Service (Dortmund)
Mes	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
2-Mercaptoethylamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
3-Mercaptopropionsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mucosol [®]	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumsulfat	Merck (Darmstadt)
Oxalsäure	Merck (Darmstadt)
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	Merck (Darmstadt)
Phospholipide	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Polyethylenimin	Polysciences (Eppelheim)
Polystyrolsulfonat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Schwefelsäure (konz.)	Merck (Darmstadt)
Tris	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck (Darmstadt)

A6 Materialien

Aluminium	Goodfellow (Huntington, USA)
5 MHz AT-cut Quarze	KVG (Niederbischofsheim)
Braune Fläschchen	Carl-Roth (Karlsruhe)
Cantilever	Digital Instruments (Santa Barbara, USA)
Fläschchenverschlüsse mit	Wheaton (Milville, USA)
Tefloneinsatz	
Glimmer	Provac AG (Schweiz)
Kalrez [®] -Dichtringe	Du Pont Company (Wilmington, USA)
Parafilm	American National Can (Chicago, USA)
Platin-Draht	Goodfellow (Huntington, USA)
Polycarbonatmembranen	Avestin (Ottawa, USA)
Reagenzgläser	bezogen über VWR International
	(Darmstadt)
Wolframschiffchen	Bal Tec (Balzers, FL)

A7 Geräte

Anodisierungsapparatur

Keithley 2400 Source Meter	Keithley Instruments (Cleveland USA)
Tektronix PS 280 DC Power Supply	Tektronix (Beaverton, USA)
Tektronix Power Supply EA-PS 9300-02	Tektronix (Beaverton, USA)
Ecoline RE 104	Lauda, Königshofen

Fluoreszenzmikroskopie

Leica DM JRE 2	Leica Microsystems Deutschland
Objektive HC PL Fluota (10 × 3), (20 × 0.5), (50 × 0.8)	

Impedanzspektrometer

Impedance Gain-Phase Analyzer SI1260	Solartron Instruments (Farnborough, GB)
---	---

Quarzmikrowaagetchnik

Frequenzzähler 53181A

Kalibrierquelle Digistant[®]

Typ 6705

Netzteil HP E3630A

Oszillatorschaltkreis

TTL SN74LS124N

Peristaltikpumpe Reglo Digital

Modell 333

Thermostat Lauda RM6

Hewlett-Packard (San Diego, USA)

Bursta Präzisionsmesstechnik (Gernsbach)

Hewlett-Packard (San Diego, USA)

Texas Instruments (Dallas, USA)

Ismatec (Wertheim-Mondfeld)

Lauda (Königshofen)

Rasterkraftmikroskopie

BioScope mit Nanoscope IIIA

Controller

Digital Instruments (Santa Barbara, USA)

Reinstwasseranlage

Milli Q RO 10 Plus

Milli Q plus 185

Millipore (Eschborn)

Sonstiges

Feinwaage Ohaus

Miniextruder Liposofast[®]pH-Meter Knick 761 *Calimatic*pH-Elektrode InLab[®] 423

Plasmareiniger PDC 32G-2

Sputter Coater 108 auto

Thickness Controller mtm 20

Ultraschallbad Bandelix Sonorex

Super RK 255 H

Ohaus (Prine Brook, New York, USA)

Avestin (Ottawa, USA)

Knick (Berlin)

Mettler Toledo Prozessanalytik (Steinbach)

Harrick (New York, USA)

Cressington (Watford, USA)

Cressington (Watford, USA)

Bandelin (Berlin)

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung sowie die vielen fachlichen Diskussionen bedanken, die mir immer wieder neue Wege aufgezeigt haben.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Galla möchte ich für seine ermutigenden Worte und die Möglichkeit danken, meine Dissertation im Institut für Biochemie zu beginnen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Gösele danke ich für die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie für ihre Unterstützung in allen Fragen, die das poröse Aluminat betrafen. Mein besonderer Dank geht hier an Dr. Kornelius Nielsch für seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine immer sehr prompte Problemlösung.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Janshoff bedanke ich mich für die Möglichkeit, rasterkraftmikroskopische Aufnahmen an der Universität Mainz anzufertigen sowie für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Frederik Höhn möchte ich für die Unterstützung in technischen Fragen und seine einfallsreichen Ideen danken. Und natürlich für die vielen netten Kaffeepausen...

Ein dickes Dankeschön geht an die Mit-Doktoranden, Diplomanden und Staatsexamler in Münster und Regensburg. Ihr habt zu einer tollen Abteilungsstimmung beigetragen, in der das Arbeiten und das anschließende Feiern und Grillen viel Spaß gemacht hat. Ganz herzlichen Dank auch für die vielen netten Worte in stressigen Zeiten, die das Arbeiten enorm erleichtert haben! War eine schöne Zeit mit Euch allen, die mir sicherlich oft fehlen wird. Hennes, Dir möchte ich dafür danken, dass Du mich am Anfang unter Deine Fittiche genommen hast und mir geduldig die rasterkraftmikroskopischen und biochemischen Details erklärt hast. Micha, tausend Dank für Deine Freundschaft! Ohne Dich wäre die Biochemie einfach nicht die Biochemie gewesen. Auch an Natascha geht ein ganz dickes Dankeschön für ihre Freundschaft und die vielen tollen Raucherpausen, die ich selbst als Nichtraucher sehr vermissen werde... Katja, Christian und vor allem Natascha, vielen lieben Dank für's Korrekturlesen.

Tausend Dank auch meinen Eltern, ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen! Mein größtes Dankeschön geht an an meinen Mann Siggie Steltenkamp, der trotz einer sehr schwierigen Zeit immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mich während der ganzen Zeit sehr unterstützt hat!

Lebenslauf

Name	Janine Drexler
geboren	22.04.1974
Familienstand	verheiratet
Eltern	Walter Drexler und Gabriele Drexler (geb. Herberhold)
Schulbildung	1980-1984 Grundschule Lippstadt 1984-1993 Gymnasium Marienschule Lippstadt Abschluss: Abitur am 11.Juni 1993
Studium	1993-1995 Grundstudium Physik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster Vordiplom im Fach Physik am 28. September 1995 1995-1996 Auslandsstudium an der University of Edinburgh, Schottland 1996-2000 Hauptstudium Physik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster Diplom im Fach Physik am 31. März 2000
Dissertation	01.04.2000: Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter Leitung von Prof. Dr C. Steinem und Prof. Dr H.-J. Galla 01.07.2001: Weiterführung der Dissertation am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. C. Steinem

